
Bachelor of Science

Herr
Marcus Ebert

**Einfluss von Chemikalien zur gen-
therapeutischen Transfektion
auf die Proliferation
stimulierter T-Zellen**

Mittweida, 2013

Bachelor of Science

Einfluss von Chemikalien zur genthe- rapeutischen Transfektion auf die Proliferation stimulierter T-Zellen

Autor:
Herr Marcus Ebert

Studiengang:
Biotechnologie/Bioinformatik

Seminargruppe:
BI10w2-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

Zweitprüfer:
Dr. rer. nat. Jana Burkhardt

Einreichung:
Mittweida, 30.09.2013

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2013

Bachelor of Science

Influence of genetherapeutic transfection chemicals on proliferation of stimulated T cells

author:
Mr. Marcus Ebert

course of studies:
Biotechnology/Bioinformatics

seminar group:
BI10w2-B

first examiner:
Prof. Dr. rer. nat. habil. Röbbbe Wünschiers

second examiner:
Dr. rer. nat. Jana Burkhardt

submission:
Mittweida, 30.09.2013

defence/ evaluation:
Mittweida, 2013

Bibliografische Beschreibung:

Ebert, Marcus:

Einfluss von Chemikalien zur gentherapeutischen Transfektion auf die Proliferation stimulierter T-Zellen - 2013. – Verzeichnisse: S.7-8, Inhalt: S.19-53, Anhang: S.63

Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik/Naturwissenschaften/
Informatik, Bachelorarbeit, 2013

Inhalt

Bibliografische Beschreibung:	4
I Abbildungsverzeichnis	6
II Tabellenverzeichnis	7
III Zusammenfassung	8
1. Einleitung	9
1.1 T-Zellen und Immunabwehr	10
1.2 Zellproliferation und Proliferationstests	12
1.3 Hämatopoetische Zellen als Grundlage von <i>in vitro</i> Proliferationstests	15
1.4 Transfektion von Gentherapeutika	17
2. Material und Methoden	24
2.1 Geräte und Chemikalien	24
2.2 Medien, Lösungen und Puffer	27
2.3 PCR-Primer	28
2.4 Oligonukleotide	28
2.5 <i>In vitro</i> Zellkultur	29
2.6 Durchführung der Experimente	30
2.7 Proliferationstests	31
2.8. Transfektion	32
2.9 BrdU-Test	33
2.10 Real-Time-PCR	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Methodenetablierung	36
3.2 Einfluss von Transfektionschemikalien auf die Proliferation	41
3.3 Einfluss von Oligonukleotiden auf die Proliferation	45
4. Diskussion	48
4.1 Methodenetablierung	48
4.2. Einfluss von Transfektionschemikalien auf die Proliferation von T-Zellen	51
5. Literatur	54
Anhang	62
Abkürzungsverzeichnis	62
Danksagung	63
Eidesstattliche Erklärung	65

I Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 – Mikroskopische Aufnahmen von ConA stimulierten Jurkat-Zellen.....	16
Abbildung 2 – Schematischer Ablauf der stabilen bzw. transienten Transfektion.....	17
Abbildung 3 – Mechanismus der Bildung von PEI/siRNA-Komplexen.....	21
Abbildung 4 – Schematischer Ablauf der Magnetofektion.....	22
Abbildung 5 – Schematischer Ablauf des LTT.....	31
Abbildung 6 – Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Tests.....	34
Abbildung 7 – Vergleich der Stimulation und Transfektion von frischer und aufgetauter Milzzellen.....	37
Abbildung 8 – Durchflusszytometrische Auswertung stimulierter PBMCs.....	38
Abbildung 9 – Einfluss der langfristigen Exposition von PEI-Komplexen auf die Proliferation.....	40
Abbildung 10 – Vergleich des Einflusses von Transfektionschemikalien auf PBMCs.....	41
Abbildung 11 – Einfluss der Transfektionschemie auf die Proliferation beim BrdU.....	42
Abbildung 12 - Einfluss reiner Magnetbeads (Matra-A) auf den Zellzyklus muriner RLD1 Zellen.....	43
Abbildung 13 – Einfluss von Magnetbeads auf die Expression von Proliferations-Genen.....	44
Abbildung 14 – Beeinflussung der Proliferation stimulierter PBMCs durch AONs.....	45
Abbildung 15 – Beeinflussung der Proliferation durch PEI und einer AON-Kombination.....	46
Abbildung 16 – Einfluss von transfizierten AONs auf die Proliferation stimulierter Milzzellen.....	47

II Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 – Verwendete Geräte.....	24
Tabelle 2 – Verwendete Software.....	24
Tabelle 3 – Verwendete Chemikalien.....	25
Tabelle 4 – Verwendete Transfektionsagenzien.....	26
Tabelle 5 – Verwendete Antikörper.....	26
Tabelle 6 – Verwendete Medien.....	27
Tabelle 7 – Verwendete Lösungen.....	27
Tabelle 8 – Verwendete PCR-Primer.....	28
Tabelle 9 – Verwendete Oligonukleotide.....	28
Tabelle 10 – Anteile der proliferierten und nicht proliferierten Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl.....	39

III Zusammenfassung

Das Immunsystem als natürliche Barriere vor schädlichen Stoffen stellt ein großes Gebiet für die medizinische Forschung dar. Dabei spielt nicht nur die Verstärkungen dieses Immunsystems eine Rolle sondern auch die Bekämpfung auftretender Immundefekte durch zum Beispiel überreagierende T-Zellen. Sie gehören zu den Lymphozyten und dienen der spezifischen Immunabwehr. Wirken die T-Zellen krankhaft, so kann es zur Ausbildung von Immunkrankheiten kommen, unter anderem der GvHD (engl. Graft versus Host Disease). Dabei greift das Transplantat den Organismus des Wirtes als Fremdkörper an. Besonders betroffen dabei sind Darm, Haut und Leber.

Das Ziel der Behandlung ist es, die Proliferation der T-Zellen so herunter zu regulieren, dass keine Abwehrreaktion vom Transplantat ausgeht. Es gibt zwei Möglichkeiten eine Inhibierung zu erlangen: Die Transfektion der T-Zellen allein mit einem Transfektionsagenz und die Transfektion mit einem Antisenseoligonukleotid (AON). Für diese Varianten werden in der folgenden Methoden Arbeit etabliert und der Einfluss der Transfektionschemikalien und der Antisenseoligonukleotide untersucht.

1. Einleitung

Als offenes System wird unser Körper täglich den unterschiedlichsten Umweltbedingungen und Stoffen ausgesetzt, auf die er reagieren muss, denn viele von ihnen können ihm schaden. Das Immunsystem, ein komplexes Netzwerk aus unspezifischen und spezifischen Faktoren, dient dem Organismus als Schutzsystem vor diesen Stoffen. Besonders deutlich tritt die Wichtigkeit des Immunsystems zu Tage, wenn durch gehemmte Aktivität, beispielsweise bei einer angeborenen Immunschwäche, oder Überreaktionen, wie zum Beispiel bei einer allergischen Reaktion, die Funktionsweise pathologisch verändert ist.

Das Immunsystem besteht aus zwei Teilen, der spezifischen und der unspezifischen Abwehr, die wiederum in Unterkategorien aufgeteilt werden können. Zwischen den beiden Teilsystemen findet zudem eine rege Interaktion statt. Das angeborene bzw. unspezifische Immunsystem ist in den meisten Lebewesen wiederzufinden und dient durch die schnelle aber unspezifische Reaktion auf Gefahrstoffe der unmittelbaren Abwehr. Es besteht unter anderem aus physikalischen Barrieren, aber auch zellulären Komponenten wie Granulozyten, Makrophagen und Monozyten, sowie humoralen Stoffen, beispielsweise dem Komplementsystem [J. Parkin & B. Cohen, 2001].

Der Abwehrmechanismus des spezifischen bzw. adaptiven Immunsystems dagegen begründet sich auf Antigen-spezifische Reaktionen. Als Antigen wird dabei ein körperfremder Stoff meist Proteine bezeichnet der von Antikörpern erkannt und bekämpft wird. Dabei muss das Antigen nicht potentiell schädlich sein. Wesentliche Bestandteile der spezifischen Abwehr sind Immunzellen, welche zum einen Antigene präsentieren (zum Beispiel B Zellen) und solche, die diese Antigene erkennen können und eine Abwehrreaktion einleiten (zum Beispiel T-Zellen) [D. Dasgupta, 1999]. Die Reaktionsgeschwindigkeit des adaptiven Immunsystems ist bei einer Reinfektion desselben Erregers stark erhöht, da Gedächtniszellen im Organismus verbleiben, die bei einer zuvor aufgetretenen Infektion eingesetzten Antikörper schnell reproduzieren können [J. Parkin & B. Cohen, 2001]. Antikörper sind ein wichtiger humoraler Bestandteil der spezifischen Abwehr und werden durch Plasmazellen ausgeschieden, die sich aus B-Zellen differenziert haben. Diese Diffe-

renzung wird nach Kontakt mit einem immunologischen Reiz ausgelöst, zum Beispiel der Aktivierung durch T-Zellen mit Hilfe von pro-inflammatorischen, also entzündungsfördernden, Signalstoffen, den sogenannten Zytokinen. Da die Funktion der B-Zellen zum Großteil auf der Aktivierung durch T-Zellen basiert, verursachen T-Zell-Immundefekte meist Störungen der B- und T-Zellantwort [C.J. Binder, 2005].

T-Zellen dienen der Erkennung von fremden Antigenen und der Weiterleitung des immunologischen Reizes zur Aktivierung der Reaktionskette des Immunsystems. Durch ihre wichtige Stellung in der Kaskade der Immunabwehr bieten sich für sie viele gentherapeutische Einsatzmöglichkeiten.

1.1 T-Zellen und Immunabwehr

T-Zellen gehören zur Gruppe der weißen Blutzellen, den Leukozyten. Bei Leukozyten handelt es sich um den Oberbegriff aller Zellen, die im Gegensatz zu roten Blutzellen keinen Blutfarbstoff, enthalten hingegen allerdings einen Zellkern. Dort bilden sie zusammen mit anderen Immunzellen, zum Beispiel den B-Zellen die Untergruppe der Lymphozyten, die Teil der spezifischen Immunabwehr sind. Die T-Zellen werden im Knochenmark gebildet und reifen im Thymus heran. Im Thymus bildet sich der T-Zellrezeptor-Komplex an ihrer Oberfläche aus. Mit diesem sind sie in der Lage Antigene zu erkennen, wenn diese durch eine Antigen-präsentierende Zelle (engl. Antigen presenting cell, APC), zum Beispiel B-Zellen präsentiert werden. Zur Aktivierung der T-Zellen, der sogenannten Stimulation, werden in der Regel neben der Bindung des T-Zell-Rezeptor-Komplexes an den Antigen-präsentierenden Rezeptor vom MHC I oder II-Typ weitere stimulierende Signale benötigt. Ein solches ko-stimulierendes Signal stellt beispielsweise die Bindung des T-Zell-ständigen CD28-Rezeptors an das B7 Protein auf der Oberfläche von APCs dar. Sind beide Signale vorhanden werden als Folge biochemischer Reaktionen Signalkaskaden ausgelöst, welche im Endeffekt zur Ausschüttung von Signalstoffen, beispielsweise pro-inflammatorischer Zytokinen führen. IL2 (Interleukin 2) ist ein solches Zytokin und reguliert die Proliferation, also klonale Vermehrung, weiterer T-Zellen. Hierfür finden sich auf der Oberfläche von T-Zellen selbst IL2-Rezeptoren, an welche das ausgeschüttete IL2 bindet und bei Überschreiten einer gewissen Konzentrationschwelle einen autoregulatorischen Effekt bis hin zur Proliferation der T-Zelle anstößt [Sharp & Abbas, 2006].

Eine Subpopulation der T-Zellen wird von den T-Helferzellen (Th) gebildet. Sie zeichnen sich durch den T-Zellrezeptor CD4 auf ihrer Zelloberfläche aus. Sie lassen sich weiter

unterscheiden in u.a. die zwei Untergruppen Th1 und Th2, welche an Hand der von ihnen auf einen Reiz hin gebildeten Zytokine unterschieden werden können. Th1 Zellen produzieren vorwiegend IL2, welches die Proliferation von T-Zellen auslöst. Sie produzieren neben IL2 auch das Zytokin Interferon γ . Durch dieses werden Makrophagen angeregt welche in Folge intrazelluläre Pathogene, wie zum Beispiel Pilze und Mykobakterien, zerstören. Th2 Zellen scheiden unter Anderem das Interleukin 4 aus, welches die weitere Differentiation der Th1-Zellen hemmt [F.A. Bonilla & H.C. Oettgen, 2010].

Die Balance zwischen Th1 und Th2, aber auch anderen Immunzellpopulationen ist empfindlich und eine Reihe von Störungen dieser Balance wurde als Ursache für zahlreiche immunologische Erkrankungen ausgemacht [B. Bolon, 2012].

Es sind viele Schritte und Komponenten notwendig, um die Immunantwort erfolgreich umzusetzen. Sobald ein Teil der Signalkaskade nicht vorhanden oder fehlerhaft ist, kommt es zu Immundefekten. Ist durch einen Gendefekt ein Teil des Immunsystems nicht gänzlich vorhanden, so ist der Körper nicht in der Lage in vollem Umfang auf Krankheitserreger zu reagieren. So können auch kleinste, meist ungefährliche Krankheiten bedrohlich, sogar tödlich verlaufen. [Parkin & Cohen, 2001]

Eine Erkrankung, die mit der Überreaktion von Immunzellen, insbesondere T-Zellen, verbunden ist, ist die Spender-gegen-Empfänger-Reaktion (GvHD, eng. Graft versus Host Disease). Zur GvHD kommt es im Verlauf einer hematopoietischen Stammzelltransplantation. Diese dient zur kausativen Behandlung von Erkrankungen des hematopoietischen Systems und somit auch des Immunsystems und wird beispielsweise bei der Therapie von Leukämien und primären Immundefekten eingesetzt. [K. Le Blanc et al., 2004] Der pathologische Mechanismus der GvHD beruht auf der Reaktion von T-Zellen im Stammzell-Transplantat eines Spenders gegenüber dem Gewebe des Empfängerorganismus. Insbesondere Haut, Leber und Darm des Transplantat-Empfängers werden angegriffen. Ein Ansatzpunkt der GvHD Therapie liegt in der Induzierung von immunologischer Toleranz [L.J. Appleman et al., 2002]. Dies kann beispielsweise durch Antikörper erreicht werden, welche die pro-inflammatorische Signalkaskade stimulierter T-Zellen durch Bindung an stimulierende T-Zell-Rezeptoren hemmen [P.S. Linsley & S.G. Nadler, 2009]. Ein neuer, innovativer Ansatz basiert auf der Reduktion der Expression Protein auf mRNA Ebene durch gentherapeutische Methoden. So gelang es Sang et al. Mit Hilfe einer siRNA, welche gegen den stimulierenden T-Zell Ko-Rezeptor CD28 gerichtet war, die Entwicklung einer GvHD im Mausmodell zu verhindern [W. Sang et al., 2011].

1.2 Zellproliferation und Proliferationstests

Unter Zellproliferation versteht man ein Wachstums beziehungsweise die Vermehrung von Zellen und Geweben, primär durch Zellteilung. Induziert werden kann die Proliferation von T-Zellen zum Beispiel durch pro-inflammatorische Stoffe wie Lektine und T-Zell spezifische Antikörper. Lektine sind Glykoproteine die ubiquitär vorkommen. Am Häufigsten sind sie jedoch in Pflanzen zu finden und wurden aus ihnen auch erstmals gewonnen. Mittlerweile besitzen sie eine lange Tradition in der Stimulation von Zellen. Sie besitzen eine Kohlenhydratstruktur und bestehen meist aus zwei Ketten die auf Grund von Proteininteraktionen miteinander verknüpft sind. Lektine sind auf der Oberfläche der Zellmembran von Pflanzenzellen zu finden. Neben der Verklumpung (Agglutination) von Erythrozyten, besitzen Lektine die Fähigkeit sich an Kohlenhydrathaltigen Zelloberflächen zu binden und dort zu reagieren. Dabei bevorzugen so vor allem Lymphozyten, welche sie durch Induktion von Mitose zur Proliferation anregen [H. Rüdiger, 1978].

Um spezifische T-Zellen zur Proliferation zu stimulieren, können verschiedene Substanzklassen eingesetzt werden. Vorwiegend kommen bestimmte Pflanzen-Lektine in Frage, beispielsweise Phytohämagglutinin (PHA). PHA stößt die Verteilung von Calcium-Ionen an, welche für die T-Zell-Aktivierung von großer Wichtigkeit sind. Auch bei der natürlichen Stimulation von Lymphozyten durch Antikörper konnte eine erhöhte Calcium-Ionen-Mobilität festgestellt werden. [H. Rüdiger, 1978] Ein weiteres häufig genutztes Lektin stellt Concanvalin A dar. Es wirkt wie PHA auch durch seinen Einfluss auf die Calcium-Ionen stimulierend auf Lymphozyten. [K O'Flynn et al., 1985] Auch Lipopolysaccharide (LPS), isoliert aus der Membran gramnegativer Bakterien, stimuliert Immunzellen, allerdings über das Oberflächenprotein CD14, welches eher auf der Oberfläche von Monozyten und Makrophagen exprimiert wird. [S.D. Wright, 1990]

Neben PHA werden inzwischen auch spezifische Antikörper gegen die T-Zell-Rezeptoren CD3 und CD28 für die *in vitro* Stimulation von T-Zellen genutzt. Die Antikörper interagieren mit den Rezeptoren entsprechend der physiologischen Antigen-Bindung vermittelt

durch Antigen-präsentierende Zellen. [S.R. Riddell & P.D. Greenberg, 1990] Um der physiologischen Reaktion noch näher zu kommen, wird anti-CD3 Antikörper heutzutage nicht mehr löslich, sondern immobilisiert verwendet und stellt so den auf der Oberfläche von APCs befindlichen MHC-Komplex nach. [F.C. Garbrecht et al., 1987]

Es besteht inzwischen auch die Möglichkeit Nanopartikel zu verwenden, die die Antikörper binden, um APCs nachzuahmen. [A. Trickett & Y.L. Kwan, 2003]

Verschiedene Testprinzipien können genutzt werden, um eine mögliche Proliferation von Zellen zu analysieren. In dieser Arbeit wurden zwei Testsysteme betrachtet: der Lymphozytentransformationstest (LTT) basierend auf radioaktiv markiertem Thymidin welches quantitativ in die Erbinformation sich teilender Immunzellen eingebaut wird [H.F. Merk, 2005] und einen Test zur Untersuchung der Zellzyklus-Kinetik während der Proliferation von Zellen basierend auf einem BrdU-Antikörper [P.N. Dean et al., 1984].

1.2.1 LTT

Der LTT ist ein typischer Proliferationstest, welcher durch den Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA die Replikation, der Verdopplung der DNA, verfolgt. Er basiert auf der Messung der absolvierten Replikationen spezifischer Lymphozyten. Nachdem eine Zellkultur mit einem Antigen (beispielsweise die genannten Stimulantien PHA oder anti-TCR-Antikörper) für einige Zeit inkubiert wurde, wird zu dieser Kultur ³H-Thymidin gegeben. Bei der Replikation wird die doppelsträngige DNA mittels Helikasen in zwei Einzelstränge aufgespalten, an denen sich neue Nukleotide unter Beachtung der Basenpaarung anbinden. Dabei gelangt das auch das radioaktive ³H-Thymidin in die neu synthetisierten DNA-Stränge. Die Stärke der gemessenen Radioaktivität gibt Aufschluss ob und wie oft die Zellen proliferiert haben. Gemessen wird die Anzahl an radioaktiven Proben pro Minute. Auf Grund der Betastrahlung des zur Markierung genutzten Tritiums ist das Markieren im letzten Schritt des LTTs nur durch geschultes Personal durchzuführen. [S. Sieben et al., 2001]

Anwendung findet der LTT in der klinischen Diagnostik. Zum Beispiel zur Untersuchung der Medikamentenallergien von Patienten [B. Halpern & N. Amache, 1967] oder zur Etablierung von neuen Medikamenten, zum Beispiel von Anti-Tuberkulose-Arznei [J. Schreiber et al, 1999].

1.2.2 BrdU-Zellzyklus-Messung

Der Zellzyklus beschreibt die Entwicklung der Zellen vom Wachstum über die Replikation (Synthese-Phase) der DNA bis hin zur Zellteilung. Er beschreibt somit im Einzelnen, wie die Proliferation von Zellen Schritt für Schritt abläuft und liefert Begründungen, warum diese auf eine bestimmte Weise stattfindet. [K. Vermeulen et al., 2003]

Mit Hilfe von modifizierten Basen, welche anstelle regulärer Basen in das Erbgut der Tochtergenerationen eingebaut werden, kann ein Zellzyklus kinetisch verfolgt werden. Eine der weit verbreitetsten Methoden zur Analyse des Zellzyklus basiert auf der Inkubation proliferierender Zellen mit 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) [P.N Dean et. Al., 1984]. Dieses wird während der Synthese-Phase in die neugebildeten DNA-Stränge eingebaut. Mit Hilfe eines Fluoreszenz-markierten Antikörpers, welcher spezifisch für BrdU ist, und im Vergleich zum gesamten DNA Gehalt einer Zelle basierend auf der Bindung des interkalierenden Farbstoffes 7-AAD (7-Aminactinomycin) lässt sich durchflusszytometrischen die aktuelle Phase des Zellzyklus jeder einzelnen Zelle in einer Probe nachweisen. [H.G. Gratzner, 1982]

Unterstützend zur Färbemethode kann eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durchgeführt werden. Damit kann die Expression von bestimmten Zellzyklusgenen nachgewiesen werden. Wichtige Zellzyklusgene sind unter anderen Cyclin 2B (CCNB2) und MKI67. Sie sind Proliferations-Marker und werden in großen Mengen synthetisiert, wenn die Zelle proliferiert.

1.2.3 Expression von Zellzyklus-Genen

Um den Einfluss von Transfektionschemikalien auf die Proliferation und den damit in Zusammenhang stehenden Zellzyklus noch näher zu beleuchten, ist es weiterhin möglich die Expression von bestimmten Zellzyklusgenen quantitativ zu vermessen. Als wichtige Zellzyklusgene erscheinen unter anderem CCNB2 und MKI67. CCNB2 kodiert für das Cyclin B2, dessen Expression besonders wichtig für die späte Phase der Mitose ist und am Ende eines vollendeten Zellzyklus verstärkt exprimiert wird [D.Gong, & J.E. Ferrell

Jr.]. Es ist außerdem in einigen onkologisch veränderten Geweben verstärkt exprimiert und wird als Krebsmarker diskutiert.

Das Gen MKI67 wurde auf Grund seiner Interaktion mit einem monoklonalen Antikörper KI-67 identifiziert. Es ist als Proliferationsmarker weithin bekannt und wird insbesondere in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert [G. Landberg & G. Roos, 1993]. Auch dieses Gen bzw. dessen Produkt werden in der aktuellen Forschung häufig als Proliferationsmarker maligner Erkrankungen verwendet.

1.3 Hämatopoetische Zellen als Grundlage von *in vitro* Proliferationstests

Zur Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die Proliferation von Immunzellen werden in der aktuellen Forschung sowohl primäre Zellen, die also frisch aus einem Spenderorganismus gewonnen werden, also auch Krebszelllinien verwendet.

Der Vorteil von primären Zellen ist die Nähe zum lebenden Organismus. Des Weiteren spielen insbesondere isolierte, primäre hämatopoetische Gewebe in *in vitro* und *in vivo* Modellen immunologischer Erkrankungen eine Rolle.. Allerdings besitzen primäre Zellen keine dauerhafte Lebenszeit und sind nicht immer zugänglich, da sie möglichst zeitnah vor den Versuchen gewonnen werden müssen. Krebszelllinien dagegen sind vielerorts verfügbar, vermehren sich anhaltend und werden in meisten Laboren bereits standardmäßig kultiviert. Zahlreiche molekularbiologische Tests wurden speziell für Zelllinien etabliert. Nachteilig ist allerdings, dass sie durch ihren unnatürlichen entarteten Zellzyklus, der sie als maligne kennzeichnet, von den primären Geweben des Organismus unterscheiden.

Als primäres Ursprungsgewebe hämatopoetischer Zellen kommen sowohl Blut(Produkte), Milzzellen, Knochenmarkszellen, Lymphknoten oder Thymuszellen in Frage. Da das Ziel dieser Arbeit in der Etablierung von *in vitro* Proliferationstest in Hinblick auf gentherapeutische Ansätze zur Behandlung einer GvHD liegt, sollen insbesondere Gewebe relevant für *in vivo* GvHD-Tiermodelle betrachtet werden. Ein weit genutztes murines GvHD-Modell basiert auf der Transplantation von Milz- und Knochenmarkszellen einer Spendermaus in eine Empfängermaus eines genetisch verschiedenen Stammes [S.Fricke et al., 2013]. Weiterhin können im Rahmen eines xenogenen Modells humane periphere

Blutzellen (PBMCs) in eine spezielle immuninkompetente Empfängermaus transplantiert werden [M.A. King, 2008]

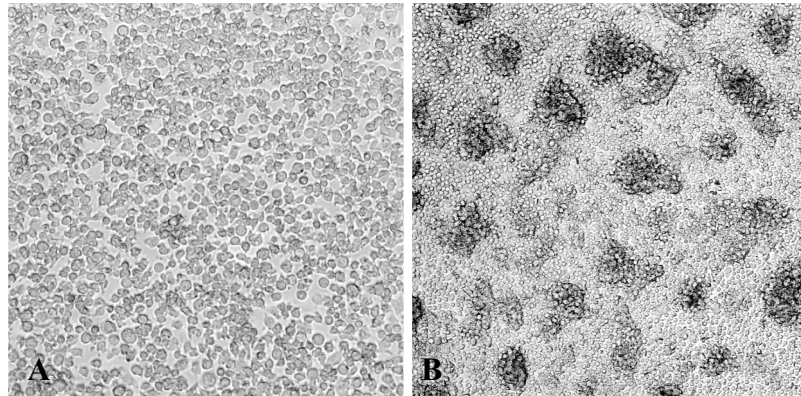


Abbildung 1 – Mikroskopische Aufnahmen von ConA stimulierten Jurkat-Zellen (A) und peripheren mononukleären Blutzellen PBMCs (B)

Die Krebszelllinie Jurkat entspricht immortalisierten humanen T-Lymphozyten. Sie wird insbesondere auch verwendet, um T-Zell-Signalwege zu erforschen auf Grund ihrer Fähigkeit Interleukin-2 zu produzieren. Die Jurkat-Zelllinie (ursprünglich genannt JM) wurde in den späten 1970er Jahren aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Jungen mit T-Zell-Leukämie etabliert. [U. Schneider et al., 1977]

Die murine immortalisierte Zelllinie RLD1 wurde etabliert durch Transplantation von Tumoren, welche zuvor durch Zellen aus Lymphknoten von den Mäusen mit Rauscher-Virus induzierter lymphatischer Leukämie stammten. Nach Stimulation beispielsweise durch DMSO ist eine Differenzierung in T-Helfer-Zellen beschrieben [N.J. de Both et al, 1983].

Die beschriebenen Zellen dienen als Testsysteme zur Etablierung von Proliferationstests relevant für gentherapeutische Ansätze der GvHD.

1.4 Transfektion von Gentherapeutika

Als Transfektion bezeichnet man das Einbringen von Nukleinsäuren, zum Beispiel zu therapeutischem Zweck, in eine Zielzelle. Die Funktion der einzubringenden Nukleinsäuren wird dabei durch ihre Sequenz und ihre chemischen Eigenschaften bestimmt. Beispielsweise bedingen bestimmte chemische Modifikationen eine Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen. Nicht jede Art der Transfektion ist für jede gewünschte Funktion einer therapeutischen Nukleinsäure geeignet. Beispielsweise eignen sich virale Transfektionsvektoren nur zur Übertragung doppelsträngigen Nukleinsäuren, aber nicht einzelsträngiger Moleküle, wie es *antisense* Oligonukleotide sind. [R.S. Geary, 2009] Im Gegenzug können prinzipiell nur doppelsträngige Nukleinsäuren in das Wirtsgenom integriert werden, ein Prozess der einerseits die dauerhafte Expression der übertragenen Sequenz gewährleisten kann, andererseits aber ein onkogenes Potential besitzt, da die ungezielte Integration s.g. Krebsgene induzieren kann. [M. Cavazzana-Calvo & A. Fischer, 2007] Abbildung 2 stellt den schematischen Ablauf, sowie die Unterschiede zwischen transients nicht-integrierender Transfektion und stabiler integrierender Transfektion dar. Im Folgenden werden einige wichtige Transfektionsvarianten beschrieben.

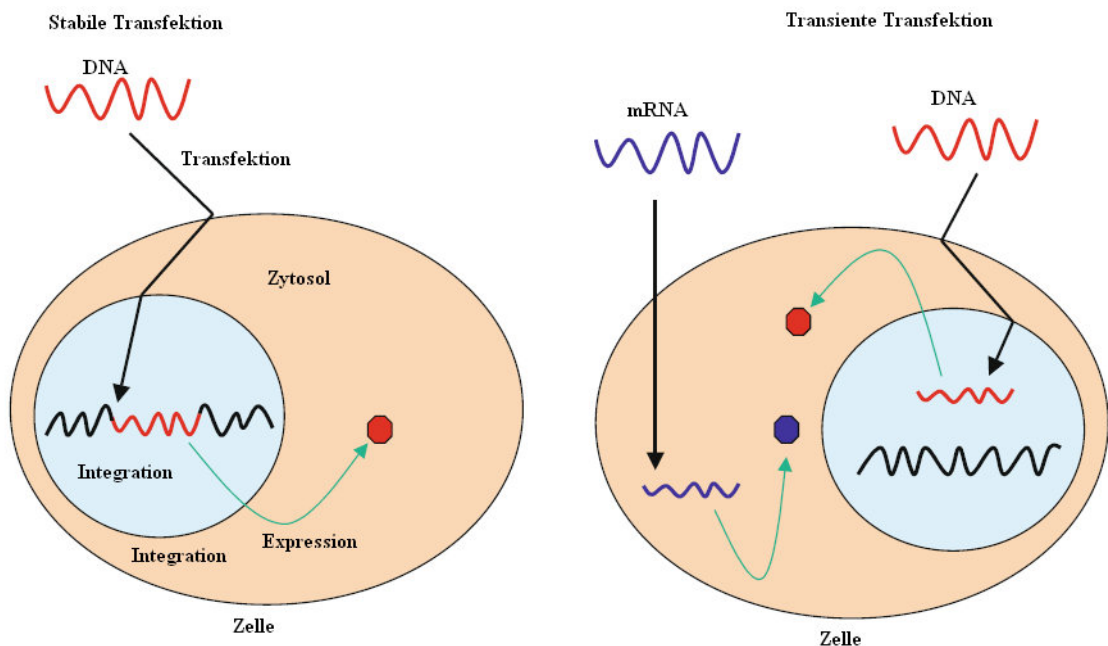


Abbildung 2 – Schematischer Ablauf der stabilen bzw. transienten Transfektion.

Man kann prinzipiell zwischen biologischen, physikalischen und chemischen Transfektionsmethoden unterscheiden. [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010]

Eine biologische Transfektion kann mittels Vektoren erfolgen. Eingesetzte Vektoren sind dabei inaktivierte Viren, wie zum Beispiel der murine Leukämievirus (MLV), oder humane Adeno-assoziierte Viren [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010].

Diese Methode besitzt eine hohe Wirkungsrate, allerdings auch Nachteile. So treten unter anderem neben zytotoxische Reaktionen auch immunogene Effekte auf. Zu dem kann es durch ungerichtete Integration zu onkogenen Effekten kommen bzw. kann eine immunogene Reaktion auftreten, bei der der Virus abgewehrt wird. Außerdem können die Viren durch unspezifische Transfektion schon vor dem eigentlichen Ziel in andere Zellen aufgenommen werden. Es können Entzündungsreaktionen ausgelöst werden bzw. können durch den zufälligen Einbau der DNA Mutationen auftreten. Ein weiterer Nachteil der viralen Vektoren ist die begrenzte Menge an Nukleinsäuren, die ihnen angehängen werden kann. Diese darf außerdem nur doppelsträngig sein, was den Einsatz für die Transfektion von siRNA und *antisense* Oligonukleotiden unmöglich macht. Weiteres Risiko geht eingesetzten Viren aus, da mit potentiell pathogenen Viren gearbeitet wird. [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010]

Physikalische Methoden nutzen unter anderen mechanischen Methoden wie die direkte Mikroinjektion oder Mikro-Partikel-Kanonen. So werden die Nukleinsäuren entweder direkt mit einer Injektion in den Nukleus bzw. das Zytoplasma gegeben oder an Goldpartikel befestigt und dann in die Zelle geschossen. [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010]

Der Nachteil der physikalischen Methoden liegt darin, dass die Methoden recht zellschädlich sind, da beispielsweise durch Elektroporation die Membramintegrität empfindlich gestört wird. Für primäre Zelle ist diese Methode daher mitunter nicht geeignet. Hinzu kommt, dass komplexe Instrumente benötigt werden und die Methoden im Vergleich recht ineffizient sind, da jedes Nukleinsäurepartikel die Zelle auch tatsächlich treffen muss. [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010]

Chemische Transfektionsmethoden sind weitverbreitet und gut etabliert. Sie gehören zu den ersten Transfektionsmethoden, die auf Säugetierzellen angewendet wurden. Es werden kationische Polymere, Calciumphosphat, kationische Aminosäuren oder kationische Lipide verwendet. [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010] Die negativ geladenen Nukleinsäuren-Moleküle bilden dabei in Verbindung mit den positiv geladenen Chemikalien stabile Komplexe. Sie bilden Komplexe basierend auf Ionen-Dipol-Wechselwirkungen. Die Aufnahme der Komplexe erfolgt ebenfalls Ladungsabhängig vermutlich via Endozytose [A. El-Aneed, 2004], ist aber im Detail zum Teil noch ungeklärt. Teilweise ungeklärt ist auch die Freisetzung der Komplexe im Inneren der Zelle. Vermutlich gibt es aber einen sogenannten Protonen-Schwamm-Effekt, der die Freisetzung der Nukleinsäuren unterstützt. [G. Zuber et al., 2001]

Die Effizienz der chemischen Transfektion hängt vom pH-Wert, dem Nukleinsäure/Chemikalien-Verhältnis und der Zellmembranstruktur ab. Auch wenn diese Methode im Vergleich zu der Transfektion mit viralen Vektoren potentiell eine geringe Transfektionseffizienz aufweist, hat sie jedoch den Vorteil das mit ihr einzelsträngige Nukleinsäuren, wie zum Beispiel siRNA, transfiziert werden können. Die Effizienz der chemischen Transfektion hängt auch besonders vom anvisierten Zelltyp ab [T. K. Kim & J.H. Eberwine, 2010], wobei Immunzellen ein eher schwer erreichbares Ziel darstellen.

Nicht alle Transfektionsmethoden sind für den im Rahmen der Arbeit verfolgten Ansatz geeignet. Da virale Transfektionsmethoden ein relativ hohes Risiko bergen und physikalische Methoden auf Grund ihrer eher zellschädigenden Eigenschaften für Transplantate ungeeignet erscheinen, wird sich diese Arbeit auf chemische Transfektionsmethoden konzentrieren. Im Folgenden sollen typische chemische Transfektionsmethoden näher erläutert werden.

1.4.1 Transfektionsarten

Die Lipofektion ist eine hocheffiziente Transfektionsmethode. Sie kann *in vivo* als auch *in vitro* angewandt werden. Die Methode basiert auf positiv geladene Liposomen. Diese bestehen wie die Zellmembran aus einer Doppellipidschicht und können so in diese integriert werden. Endozytose beschreibt diesen Vorgang. Dabei kommt es zu einer Einstülpung der Zellmembran, in welche der Partikel sich bewegt. Er wird vollkommen von der Membran umgeben und als Vesikel weiter in die Zelle transportiert. Durch Lipofektionschemikalien wird dieser Vorgang unterstützt, da sie denselben Aufbau wie die Zellmembran besitzen. Bei der Aufnahme der Liposomen in die Zellen können so die angehängenen, negativen Nukleinsäure-Moleküle in die Zelle gelangen. Die Aufnahme in den Zellkern, den Wirkort von Antisenseoligonukleotiden, erfolgt dann in einem weitestgehend ungeklärten Mechanismus vermutlich durch Kernporen [Felgner PL et al., 1978]

Die Nukleinsäuren können auf zwei Wegen an den Liposomen fixiert werden. Entweder befindet sie sich auf der Oberfläche oder sie ist von der Doppellipidschicht des Vesikels umgeben. [Felgner PL et al., 1978]

Als kationisches Polymer wurde Polyethylenimin (PEI) verwendet. Es besitzt eine hohe Kationen-Ladungs-Dichte und kann so viele negative Nukleotide an sich binden. Außerdem besitzt es eine hohe Pufferkapazität in nahezu allen pH-Bereichen. [O. Boussif et al, 1995]

Die Nanoartikel gelangen mittels Endozytose in die Zellen, in der die adhärennten Nukleinsäuremoleküle höchstwahrscheinlich durch den Protonen-Schwamm-Effekt von den PEI-Partikeln gelöst werden (Abb. 4). [G. Zuber et al., 2001]

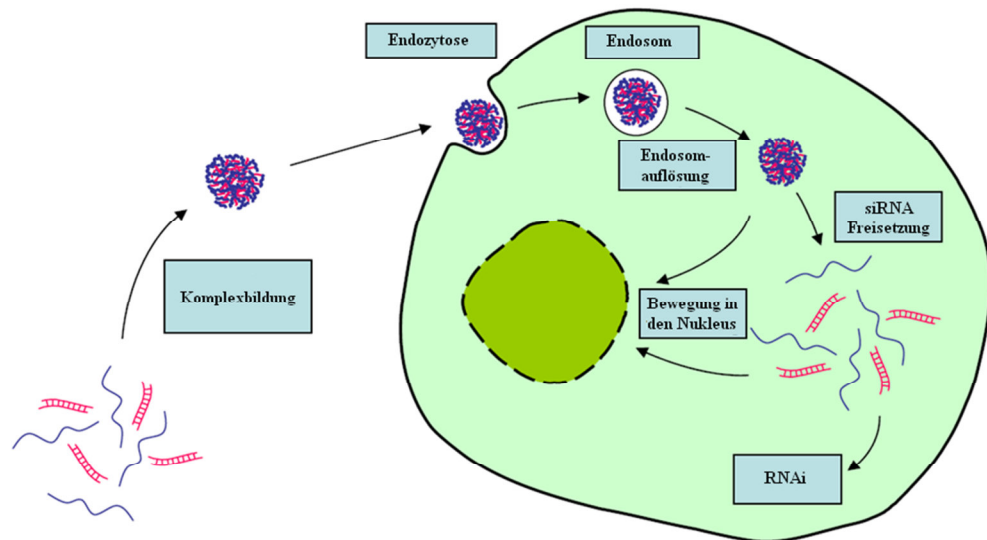


Abbildung 3 – Mechanismus der Bildung von PEI/siRN-Komplexen, deren Aufnahme und intrazellulärer siRNA-Freisetzung. [J. Aigner, 2006]

Eine weitere mechanische Transfektionsmethode, die verwendet wurde, ist die Magnetofektion. Sie wurde 1970 von Widder et al. beschrieben und erstmals im Jahr 2000 von C. Mah, B. Byrne sowohl *in vivo* als auch *in vitro* demonstriert. Bei der *in vitro* Transfektion liegt das Gemisch aus genetischem Material und Nanopartikeln suspendiert vor und wird nach der Adhäsion zu den Zellen gegeben. Die Fixierung kann entweder auf den, meist aus Eisenoxid bestehenden, Partikeln stattfinden oder auf einem Carrier, der als Bindung zwischen dem genetischen Material und dem Nanopartikel dient. Die Nanopartikel werden bei *in vitro* Experimenten mit kationischen Substanzen beschichtet. So wird das gewünschte genetische Material leicht an ihrer Oberfläche fixiert. Im Anschluss wird ein Magnet unter der Zellkulturplatte positioniert (Abb. 4). Die Magnetofektion besitzt eine recht hohe Effektivität, die wiederum ebenfalls abhängig von der Art der Zielzellen ist. Dies liegt daran, dass durch vorherige Adhäsion, also Immobilisierung, der Zielzellen und der gerichteten Aufbringung und Steuerung der magnetischen Nanopartikel ein sehr hoher Grad an Kontakt zwischen Nukleinsäuren und Zielzellen besteht. Im Gegensatz zu beispielsweise Lipofektionsreagenzien, bei denen die Häufigkeit des Kontaktes zwischen Nanopartikel-Nukleinsäure und Zielzelle rein stöchiometrischer Natur ist. [J. Dobson, 2006]

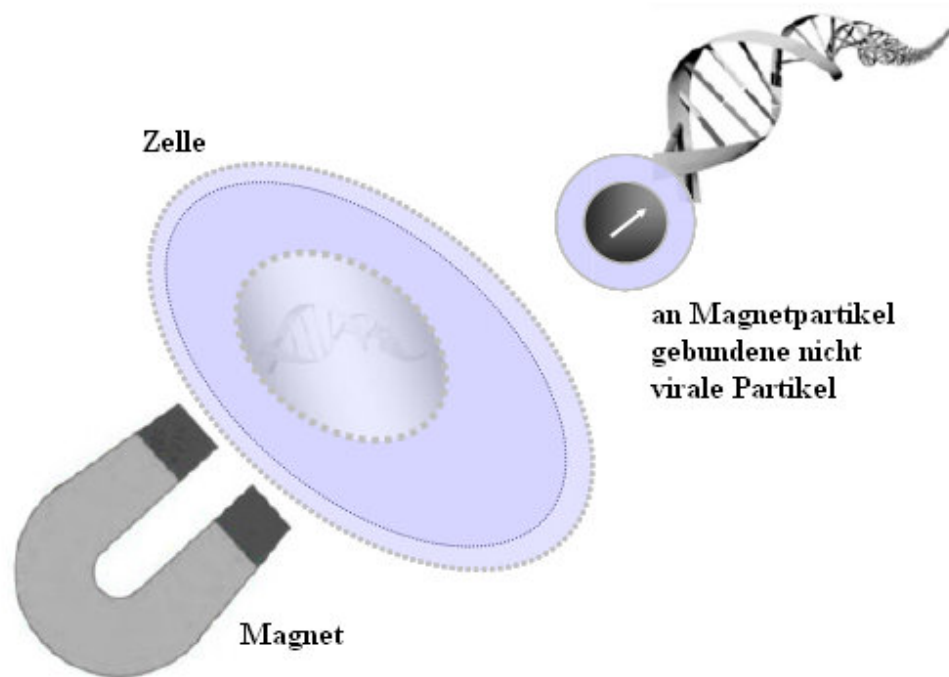


Abbildung 4 – Schematischer Ablauf der Magnetofektion. Der zu transfizierende, biologische, nicht virale Partikel wird an ein Magnetpartikel durch die unterschiedlichen Ionenladung der beiden Teilchen gebunden. Anschließend werden alle so beschichteten Magnetpartikel durch ein Magnetfeld an die Zielzelle bewegt, sodass diese in die Zelle gelangen können. [C. Plank et al., 2011]

Als Besonderheit der Magnetpartikel-vermittelten Transfektion ergibt sich die Kombi-
nierbarkeit mit Lipofektionsreagenzien oder kationischen Polymeren. So können die
magnetischen Partikel auf Grund spezieller Oberflächenbeschichtungen auch an Lipo-
komplexe oder kationische Polymerkomplexe gebunden werden und die Transfektionsef-
fizienz dieser weiter steigern. [C. Plank et al., 2011]

Die beschriebenen Transfektionsmethoden können zur Übertragung verschiedener Arten
therapeutischer Nukleinsäuren in die Zielzellen dienen. Im Folgenden seien einige gängi-
ge Arten von Nukleinsäuren beschrieben.

1.4.2. Arten von Gentherapeutika

Es gibt viele Arten von Gentherapeutika, beispielsweise ganze Gene, Plasmide, siRNA oder *antisense* Oligonukleotide. Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle, welche in Bakterien vorkommen. Sie können als Vektoren dienen, um Gene in eine Zielzelle zu transferieren. Dabei muss das Plasmid mittels Restriktionsenzymen geteilt und mit Hilfe integrierender Polymerasen wird das zu übertragende Gen eingebaut. Bakterielle oder virale Plasmide kommen in der Regel nicht im Menschen vor und können dadurch inflammatorische Reaktionen auslösen. [I.A. Pringle et al., 2012]

Small interfering RNA (siRNA) sind kleine doppelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge zwischen 19-23 Basen. Sie dienen der posttranskriptionalen Hemmung von Genen. Unmodifiziert können sie auf Grund ihrer Ähnlichkeit mit viralem Erbgut proinflammatorisch wirken. Ihre Funktion entfalten sie über den RNAi-Komplex (RNA *induced gene silencing*), wobei die siRNA durch das Enzym Dicer gespalten und in den Komplex eingebaut wird, der dann wiederum mRNA abbauende RNAsen rekrutiert und somit die Expression des Zielgenes reduziert. [S. Oliviera et al., 2006]

Antisense Oligonukleotide (AON) sind kurze einzelsträngige RNA-Moleküle, die spezifisch an einer Ziel-mRNA binden. Dadurch kann die Translation der mRNA verhindert werden. Dieser Effekt wurde erstmals 1977 beschrieben. [B.M et al, 1977] Wie heute bekannt ist, basiert die Funktion von AONs jedoch nicht nur auf diesem Mechanismus, sondern u.a. auch auf der Rekrutierung des RNA abbauenden Enzyms RNase H [R.Y. Walder & J.A. Walder, 1988], sowie der Behinderung von, für das korrekte Splicing eines Transkripts, notwendigen Faktoren [F.S. Hassane, 2009]. Im Endeffekt bewirken AONs so ähnlichen den siRNAs eine Reduktion der Expressionsmenge des Zielgens. *Antisense* Oligonukleotide (AON) können allerdings umfangreich chemisch modifiziert werden. Dies dient der Stabilisierung der Moleküle vor zellulären Abbaumechanismen, sowie der Verhinderung möglicher unspezifischer Nebenwirkungen. Insbesondere 2'-O-methylierte Basen und ein Phosphorthioat-Rückgrad ermöglichen stabile, nebenwirkungsarme gentherapeutische Komplexe. So war auch das erste für die klinische Anwendung zugelassene Gentherapeutikum ein *antisense* Oligonukleotid namens „Fomivirsen“ [G.J. van Gommen, 2008].

Auf Grund des onkogenen Potentials konzentriert sich diese Forschungsarbeiten im Folgenden auf nicht integrierende Transfektionsmethoden, da die Übertragung bzw. Translation der Ergebnisse in die Klinik geplant ist. Deswegen wird der Fokus primär auf siRNA oder *antisense* Techniken mit physiko-chemischen Transfektionsmethoden gesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Chemikalien

2.1.1 Geräte

Tabelle 1 – Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Analyssewaage	satorius	-
Durchflusszytometer	BDbioscience	FACS Canto II
Inkubator	Nikon	Hera cell 240
Mikroskop	ZEISS	Axiovert 25
PCR Cycler	AppliedBiosystems	7500 Real Time PCR System
Real Time PCR Folie	AppliedBiosystems	MicroAmp® Optical Adhesive Film
Real Time PCR Reaktionsgefäße	AppliedBiosystems	MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate
Schockgefriergefäß	Thermo Scientific	Mr. Frosty
Sicherheitswerkbank	Kojair	Biowizard
Strahlungsmessgerät	Wallac	TRILUX 1450
Zellsieb	BDbioscience	70µm Durchmesser
Zentrifuge	Hettich	Rotina 420R

2.1.2 Software

Tabelle 2 – Verwendete Software

Software	Hersteller	Anwendung
FACSDiva (Version 6.1.3)	BDbioscience	Auswertung durchflusszytometrische Analysen
7500 Software v2.0.6	AppliedBiosystems	Aufnahme und Bearbeitung der Real Time PCR Daten

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 3 – Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
DMSO	Sigma-Aldrich
Fetales Kälber Serum	Gibco®
HOT FIREPol®EvaGreen® qPCR MIX Plus (ROX)	AppliedBiosystems
Molekularbiologisches Wasser	AppliedBiosystems
4 % Paraformaldehyd	MORPHISTO
PHA	Sigma-Aldrich
Trypanblau	AppliChem
ConA	Sigma-Aldrich
Ficoll	Sigma-Aldrich
7-AAD	BDbiosciences
Trizol®	Invitrogen
Chloroform	appliChem
Isopropanol	
Ethanol	

Tabelle 4 – Verwendete Transfektionschemikalien

CombiMag	chemicell	Magnetofektion	OZ Biosciences
Enhancer	PromoCell	Magnetofektion	H. Gul-Uludag et al. (2012)
FluidMag	chemicell	Magnetofektion	S. Werth et al. (2006)
Ibafect	PromoCell	Kationisches polymer	H. Gul-Uludag et al. (2012)
JetPEI®	Polyplus	Lipofektion	Polyplus
JetPRIME®	Polyplus	Lipofektion	Polyplus
Lipofektamin	Gestellt von UFZ Leipzig	Lipofektion	H. Gul-Uludag et al. (2012)
Matra-A	PromoCell	Magnetofektion	J. Beisner et al. (2008)
PEI	Gestellt von Prof. Aigner, Universität Leipzig	kationisches Polymer	S. Werth et al. (2006)
Promofektin	PromoCell	Lipofektion	PromoCell

2.1.4 Antikörper

Tabelle 5 – Verwendete Antikörper

Antikörper	Hersteller	Spenderorganismus	Klon-ID
Anti-CD3e human	eBioscience	Maus	UCHT1
Anti-CD3e murin	eBioscience	Armenischer Hamster	145-2C11
Anti-CD28 human	eBioscience	Maus	UCHT1
Anti-CD28 murin	eBioscience	Golden Syrian Hamster	37.51

2.2 Medien, Lösungen und Puffer

Die folgenden Tabellen beinhalten verwendete Medien und Lösungen sowie deren Zusammensetzung.

Tabelle 6 – Verwendete Medien

Medien	Substanz	Konzentration	Hersteller
1x RPMI 1640	31870 – RMPI 1640, ohne Glutamin	nach Herstellerangaben	gibco
Zusätze	FKS	10 %	Sigma-Aldrich
X-Vivo	Nach Lonza 04-380Q	nach Herstellerangaben	Lonza

Tabelle 7 – Verwendete Lösungen

Lösungen	Substanz	Konzentration	Hersteller
DBPS	Nach SKU Nr. 14190-086	nach Herstellerangaben	Gibco®
HN-Puffer	10 mM Hepes, 0.1 M NaCl, pH 7.4	nach Herstellerangaben	Sigma-Aldrich

2.3 PCR-Primer

Tabelle 8 – Verwendete PCR-Primer

Zielgen	Vorwärts-Sequenz	Rückwärts-Sequenz
RPLP0	GGCGACCTGGAAGTCCAAC	CCATCAGCACCACAGCCTTC
MKI67	CCAGCTTCCTGTTGTGTCAA	AGCCGTACAGGCTCATCAAT
CCNB2	AAAGTTGGCTCCAAAGGGTCCTT	GAAACTGGCTGAACCTGTAAAAAT

2.4 Oligonukleotide

Tabelle 9 – Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Hersteller	Organismus	Sequenz
aCD4mu-AON	Eurofins mwg operon	Maus	Vertraulich
aCD28mu-AON		Maus	Vertraulich
aCD4hu-AON		human	Vertraulich
aCD28hu-AON		human	Vertraulich
scrambled-AON		Maus	UCCACCAACCACCACCAGCA
scrambled-AON		human	CAAGGCGAUUACACUACCU
aCD4-siRNA	Qiagen	human	Vertraulich

2.5 *In vitro* Zellkultur

Es wurden sowohl humane als auch murine Zellen für *in vitro* Versuche verwendet.

Primäre Milzzellen wurden am Versuchstag aus CD1 Auszucht Mäusen nach tierschutzgerechter Euthanasie (Tötungsanzeige T77/13) mit CO₂ gewonnen. Nach der Präparation der Milzen wurden die Milzzellen durch 70 µm Zellsiebe von BD vereinzelt und anschließend mit 2 x je 10 ml PBS gewaschen (Zentrifugation bei 300 x g, je 5 min).

Primäre periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) wurden aus Buffy Coat, bezogen aus der Blutspende des Instituts für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Leipzigs, von drei verschiedenen Spendern durch Ficoll-Dichtegradienten-Zentrifugation gewonnen. Hierbei wurde der Buffy Coat im Verhältnis 1:3 mit PBS versetzt und vorsichtig über 10 ml vorgegebenes Ficoll im 50 ml Zentrifugationsröhrchen überschichtet. Diese trennt das Blut in mehrere Phasen entsprechend der spezifischen Dichte der Blutbestandteile auf, wobei sich die gewünschten PBMCs in der Interphase befinden. Die Interphase wurde nach Zentrifugation (1000 x g, 10 min ohne Bremse) abgenommen und die darin enthaltenen Zellen 2-mal in 10 ml PBS gewaschen. Die so gewonnenen PBMCs wurden zu Lagerung kryokonserviert oder frisch verwendet.

Zur Kryokonservierung wurden 5×10^7 Zellen in 900 µl reinem FKS resuspendiert und bei 4°C in ein gekühltes Kryotube gegeben, bevor weitere 100 µl DMSO (Endkonzentration 10%) hinzugegeben wurden. Die Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei -80 °C im Mr. Frosty (Kryokonservierungs-Container mit isopropanolhaltiger Doppelwand) gelagert um eine Temperaturabsenkung von 1°C/Minute zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Überführung in einen -150 °C Tiefkühlschrank oder flüssigen Stickstoff.

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgte standardmäßig in 1x RPMI 1640 mit einem Zusatz von 10 % FKS bei 37 °C, 100% Luftfeuchte und 5 % CO₂. Als Ausnahme wurde serumfreies X-Vivo T-Zell Medium (Lonza) verwendet, wenn es die Transfektionsprotokolle erforderten.

Das Auftauen der kryokonservierten Zellen erfolgte nach einem Standardprotokoll. Die Zellen wurden möglichst schnell durch ein Wasserbad aufgetaut, bis keinerlei feste Bestandteile mehr vorhanden waren. Die 1 ml Zellen wurden in 9 ml Medium (37 °C) gegeben. Die Zellen wurden bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert und es folgte ein weiterer Wachschriff mit 10 ml Medium (37 °C) bei 300 g und 5 Minuten. Danach wurden die Zellen in 3 ml resuspendiert.

Das Medium wurde standardmäßig aller zwei Tage gewechselt. Dabei wurde die Zellsuspension aus der Zellkulturflasche in ein Zentrifugenröhrchen überführt und die Zellen durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g pelletiert, das Medium entfernt und das Pellet in frischem Medium erneut aufgenommen. Hierbei erfolgte standardmäßig die Zellzählung um eine für das Wachstum der Zellen optimale Konzentration der Zellen im Medium zu gewährleisten.

Die Zellzählung erfolgte in einer Neubauer Zählkammer, wobei eine 1:10 in Trypanblau verdünnte Zellsuspension verwendet wurde. Bei einer 10-fachen Vergrößerung wurden 16 Großquadrate gezählt. Die Vitalität errechnet sich aus dem Verhältnis lebender (ungefärbter) Zellen zur Gesamtzellzahl.

2.6 Durchführung der Experimente

2.6.1 Stimulation

Die Antikörper anti-CD3e und anti-CD28 wurden je paarweise verwendet. Es wurden sowohl human-spezifische als auch murine Antikörper verwendet. Diese wurden wie folgt eingesetzt: Anfangs wurden 96 Mikrotiterplatten mit anti-CD3e Antikörper in einer Konzentration von 5 µg in 50 µl in PBS für 2 h bei 37 °C inkubiert um eine Beschichtung des Wellbodens zu gewährleisten. Nach der Inkubation wurden die Restlösung 2-malig durch waschen mit je 200 µl PBS entfernt und die Zellen in den gewünschten Konzentrationen ausgesät. Im Anschluss wurde der lösliche aCD28 Antikörper in einer Menge von 0,4 µg in 9,6 µl PBS hinzugegeben und für 24 – 48 h inkubiert.

Die Stimulation mit PHA (Phytohämagglutinin) erfolgte mit einer Konzentration von 0,05 mg/Kavität oder mit ConA (Concanavalin A) mit einer Konzentration von 0,1 µg/Kavität. Es erfolgte auch die kombinierte Stimulation mit Antikörpern nach oben stehendem Protokoll und PHA, wobei PHA in der angegebenen Konzentration zeitgleich mit aCD28 Antikörper in die Wells gegeben wurde.

2.7 Proliferationstests

2.7.1 Lymphozytentransformationstest

Der Lymphozytentransformationstest dient zur Analyse der Replikation spezifizierter T-Zellen. Dabei wurden 2×10^5 Zellen in je 200 μ l Medium in 96er Kavitäten einer Zellkulturplatte vorgegeben. Erfolgte die Stimulation mit Antikörpern, wurden diese zuvor, wie oben beschrieben, mit aCD3e beschichtet. Die Behandlung mit Transfektionschemikalien erfolgte ggf. am Tag des Versuchsbeginns (Tag 0) oder Tag 1, wobei ggf. ein Waschschritt mit Überführung in neuen Wells und ggf. Erneuerung der Stimulation an Tag 1 erfolgte.

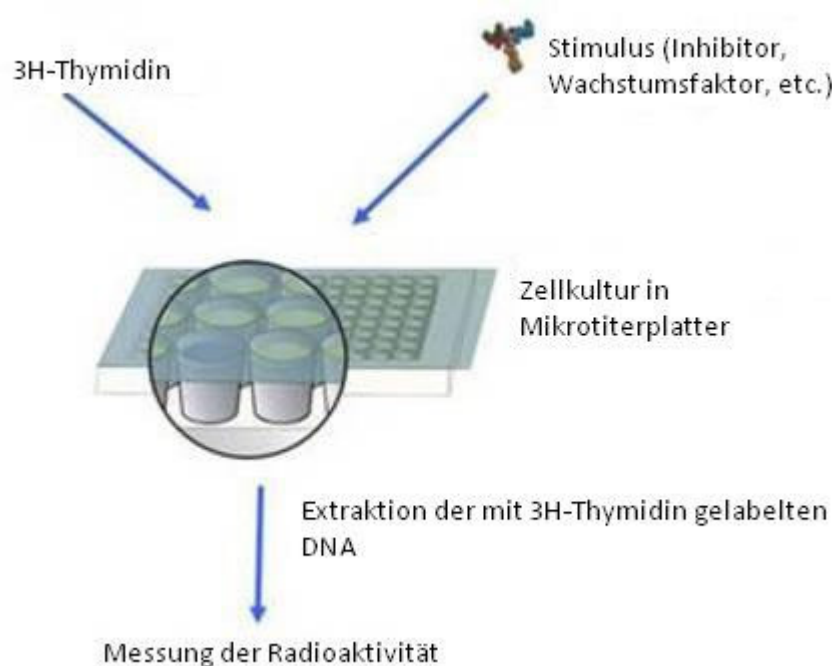


Abbildung 5 – Schematischer Ablauf des LTT.

An Tag 3 erfolgte die Zugabe von 3H-Thymidin. Die Messung der aufgenommenen Radioaktivität erfolgte auf Grund von Sicherheitsvorschriften in einem Fachlabor des Instituts für Transfusionsmedizin der medizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Abteilung Diagnostik, durch fachkundiges zertifiziertes Personal (MTA Katrin Bauer) mit dem TRILUX 1450 der Firma Wallac. Als Ergebnis wird die Radioaktivität in cell counts per minute (ccpm) erhalten, welche mit der Proliferationsaktivität der gemessenen Zellen korreliert.

2.8. Transfektion

Alle Transfektionschemikalien wurden nach dem jeweiligen Herstellerkit angewendet. Für die Magnetofektion wurden Partikel aus Eisenoxid genutzt, die mit Polykationen beschichtete sind. Die Partikel besitzen einen Durchmesser von 100-200 nm. [P. Ha-Lien Tran et al., 2012]

Als Erstes wurden die verwendeten Antisense Oligonukleotide bzw. Plasmide (125-1000 ng) in einer Suspension aus Magnetbeads gelöst um eine Endkonzentration von 1:1 – 1:40 zu erhalten. Anschließend inkubierte das Gemisch für 15 Minuten bei Raumtemperatur.

Darauf wurde das Gemisch den zuvor ausgesäten Zellen (2×10^5) zugegeben. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 96er Flachbett-Kavitäten mit 200 µl Medium je Kavität. Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf eine Permanentmagnetplatte (universal Platte, Promocell) gestellt. Bei einer kombiniert durchgeführten Lipofektion und Magnetofektion wurde die mit Nukleinsäure beschichteten Nanopartikel vor der Zugabe der Magnetpartikel für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Nukleinsäuren an die Liposomen binden konnten. Für die Lipofektion allein wurden die Nukleinsäuren für 30 Minuten mit dem Lipofektionsagens bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie für 24-48 h zu den Zellen pipettiert.

Für die Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) wurde das PEI (25 kDa, SigmaAldrich) vorher nach Werth et al. modifiziert. [S. Werth et al., 2006] Für den kombinierten Einsatz von PEI und Magnetpartikeln, wurde FluidMag (von Chemicell) PEI hinzugegeben. Die Mischung wurde bei 4 °C bis zum Versuch gelagert.

2.9 BrdU-Test

Der BrdU-Test zur Untersuchung und Verfolgung des Zellzyklus wurde nach dem Protokoll des APC BrdU Flow Kits von BDbioscience durchgeführt.

Es wurden 2×10^5 Zellen (PBMCs) je Well entsprechend oben stehenden Protokollen transfiziert und stimuliert. Anschließend wurden 20 μ L einer BrdU-Solution mit einer Konzentration von 10 μ L/ml je Well zugegeben.

Es wurden Proben von je 50 μ L am Tag 0, 1, 3, 6 und 12 genommen und nach einmaligem Waschen mit 1 ml Medium in 200 μ L 1 % PBS-PFA resuspendiert und fixiert. Alle Proben wurden als Duplikate angefertigt. Nach der Ernte aller Proben erfolgte die Färbung: Die Proben wurden pelettiert und die Pellets in 50 μ L BD Cytotfix resuspendiert und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift, wobei die Zellen pelettiert und in je 1 ml BD Perm/Waschpuffer resuspendiert und erneut pelettiert wurden. Das entstandene Zellpellet wurde erneut in 50 μ L BD Cytotfix resuspendiert. Anschließend lagerten die Zellen 10 Minuten auf Eis und es folgte erneut der oben beschriebene Waschschrift und einer Inkubation für in 50 μ L DNase-Lösung mit einer Konzentration von 300 μ g/ml für 1 h bei 37 °C. Es schloss sich erneut ein Waschschrift an. Die Zellen wurden abschließend in 25 μ L BD Antikörperlösung (APC-konjugierte anti-BrdU Antikörper) aufgenommen und für weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Es erfolgte ein letzter Waschschrift nach dem das Zellpellet in 200 μ L 1 % PBS-PFA Lösung resuspendiert wurde. Es wird anti-BrdU-APC (entspricht der neuen DNA je Zellteilung) im Verhältnis zu 7-AAD, was dem Gesamt-DNA-Gehalt entspricht, da der Farbstoff interskalierend ist, vermessen. Im Anschluss dieser Behandlung wurden alle Proben Mittels des BD FACSCanto II durchflusszytometrisch spezifisch für das Fluorochrom APC gemessen und durch das Programm FACSDiva von BD ausgewertet (Abb. 6).

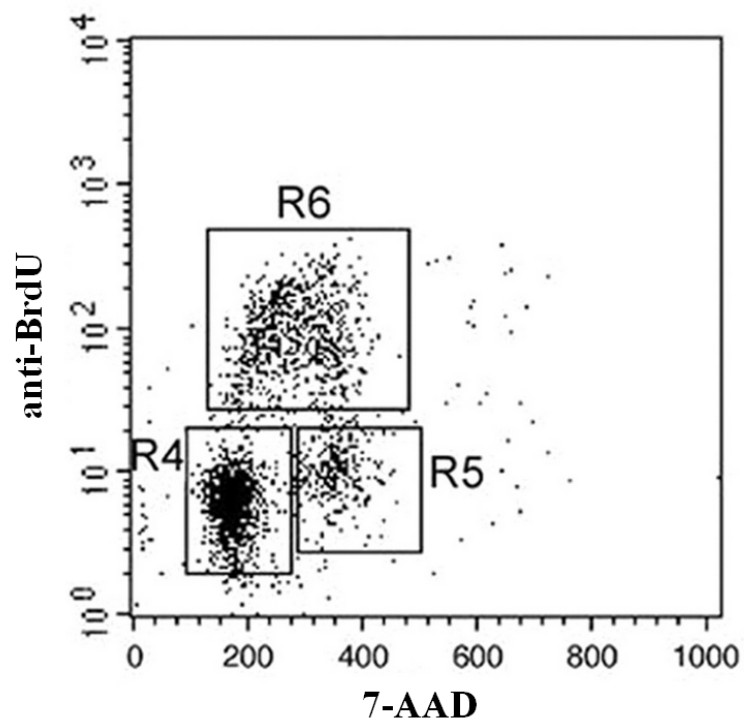


Abbildung 6 – Durchflusszytometrische Analyse des BrdU-Tests- Die Gates R4-6 stehen für verschiedene Stadien des Zellzyklus. R4 zeigt alle Zellen in G0/G1-Phase, R5 zeigt die G2 +Mitosephase und R6 zeigt die Zellen, die sich in der S-Phase befinden. [Y.H. Wang et al., 2007]

2.10 Real-Time-PCR

Mit Transfektionschemikalien behandelte stimulierte und unstimulierte Zellen wurden wie oben stehend kultiviert und geerntet. Das Zell-Pellet wurde bei der Ernte in 0.5 ml Trizol (Invitrogen) aufgenommen. Für die Synthese der cDNA wurde das RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit (ThermoScientific) verwendet. Die Real-Time PCR Amplifikation für die Zielgene CCNB2 und KI67 und das Houskeeping-Gen RPLP0 wurde mit Hilfe des 7500 Realtime PCR System Cyclor von Applied Biosystems durchgeführt.

Zuerst wurden 50 ng cDNA mit 0,3 U BioTaq™ Polymerase (Bioline) vermenkt und anschließend die entsprechende Menge Enzympuffer, 2,5 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 4 µl SYBR Green und je 0,32 µM der Primer hinzugegeben.

Die PCR wurde bei 94 °C für 10 Minuten initiiert, gefolgt von 40 Zyklen (20 s, 95 °C; 20 s, 58 °C). Abschließend wurde eine Schmelzkurve (95 °C bis 40 °C bei 0,1 °C/s) erstellt. Als Qualitätskontrolle wurden zum einen die erhaltenen Schmelzkurven analysiert und eine Gelelektrophorese der PCR Produkte durchgeführt. Zur Auswertung erfolgte die Korrektur der Zielgenexpression anhand der Expression des Housekeeping-Genes durch Differenzenbildung der Cycle-Tresholds (Ct-Werte). Des Weiteren wurden Kontraste ebenfalls durch Differenzen-Bildung berechnet. Der foldchange wurde durch Logarithmierung der Ct-Werte zur Basis 2 berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Methodenetablierung

3.1.1 Zellauswahl

Um den Einfluss von Transfektionschemikalien zu messen, wurden verschiedene Zellsysteme verwendet. Dies ist zum einen darin begründet, dass in Hinblick auf die Anwendung der Daten zur Erforschung von GvHD-Therapeutika verschiedene GvHD Tiermodelle etabliert sind. Diese basieren zum einen auf der Transplantation von murinen Milzzellen zusammen mit murinen Knochenmarkszellen in einem vom Spender verschiedenen Empfänger-Maus-Stamm. [A.J. Beres & W.R. Drobyski, 2013] Zum anderen kommen humanisierte xenogene Modelle in Frage, bei denen primäre PBMCs in eine immuninkompetente Empfängermaus transplantiert werden.

Da außerdem in der Erforschung immunologischer Erkrankungen häufig Zelllinien eingesetzt werden, werden auch diese hier näher betrachtet. Zum einen kommt die murine T-Zelllinie RLD1 zum Einsatz, zum anderen die humane T-Zelllinie Jurkat.

Da die o.g. Gewinnung primärer Zellen zeitaufwändig ist, werden diese häufig kryokonserviert und nach einem Auftauzyklus in Experimenten eingesetzt. Für PBMCs ist die stabile Proliferation auch nach dem Auftauen beschrieben und konnte auch in unseren Experimenten aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Um den Einfluss des Auftauvorganges auf primäre murine Zellen zu untersuchen, wurden frische und aufgetaute murine Milzzellen, die direkt am Versuchstag gewonnen und Zellen, die 24h vor Versuchsbeginn kultiviert wurden verglichen. Es wurden für beide Seiten je drei Spender untersucht. Die Stimulation erfolgte mit PHA oder aCD3e/aCD28 Antikörpern (AK). Die Ergebnisse des LTT sind in Abbildung 7 dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sowohl längere Kultivierung als auch Kryokonservierung einen entscheidenden Einfluss auf die Proliferation muriner Milzzellen ausüben. Die Einflüsse führen zur Notwendigkeit frische primäre Milzzellen zu verwenden, da andernfalls kaum noch Proliferation gemessen werden kann.

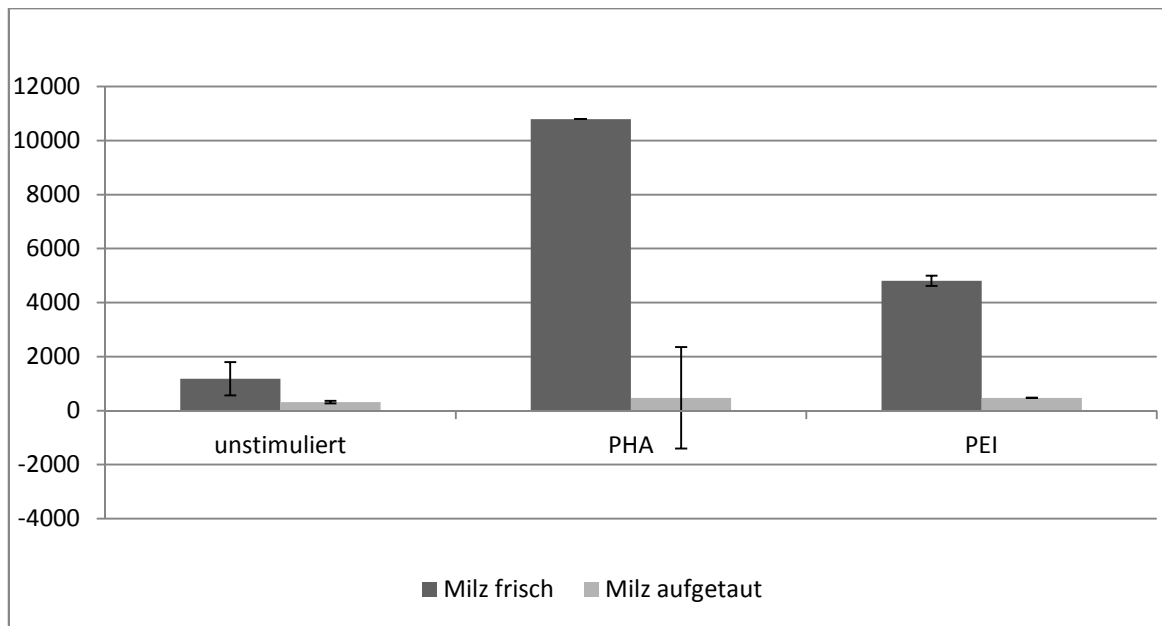


Abbildung 7 – Vergleich der Stimulation von frischen und aufgetauten Milzzellen (PEI und PHA+PEI). Aufgetragen ist die Abhängigkeit des Proliferations-Maßes CCPM von der Transfektion. Mit dunkelgrauen Balken sind die frischen Milzzellen und mit Grauen die aufgetauten Milzzellen dargestellt.

3.1.2 Einfluss der Stimulationsagenzien auf PBMCs

Um potentiell Immuntherapeutika an möglichst physiologischen Testsystemen entwickeln zu können, wurden verschiedene Stimulantien auf deren Einfluss auf eine PBMC Population hin untersucht. Es wurde ConA, PHA und Antikörper jeweils allein und eine Kombination aus PHA und Antikörpern verwendet. Die Beurteilung des Stimulationserfolges erfolgte mit Hilfe durchflusszytometrischer Analyse, wobei anhand der Granularität (sideward scatter, SSC) und der Zellgröße (foward scatter, FSC) die Population der Lymphozyten im PBMC Zellgemisch verfolgt werden kann.

In der Kontrolle (Abb. 8A) ist eine Dichte Punktwolke zu erkennen, die die ruhende Lymphozyten-Population der PBMCs darstellt (P2), sowie eine proliferierende Population von Lymphoblasten (P3).

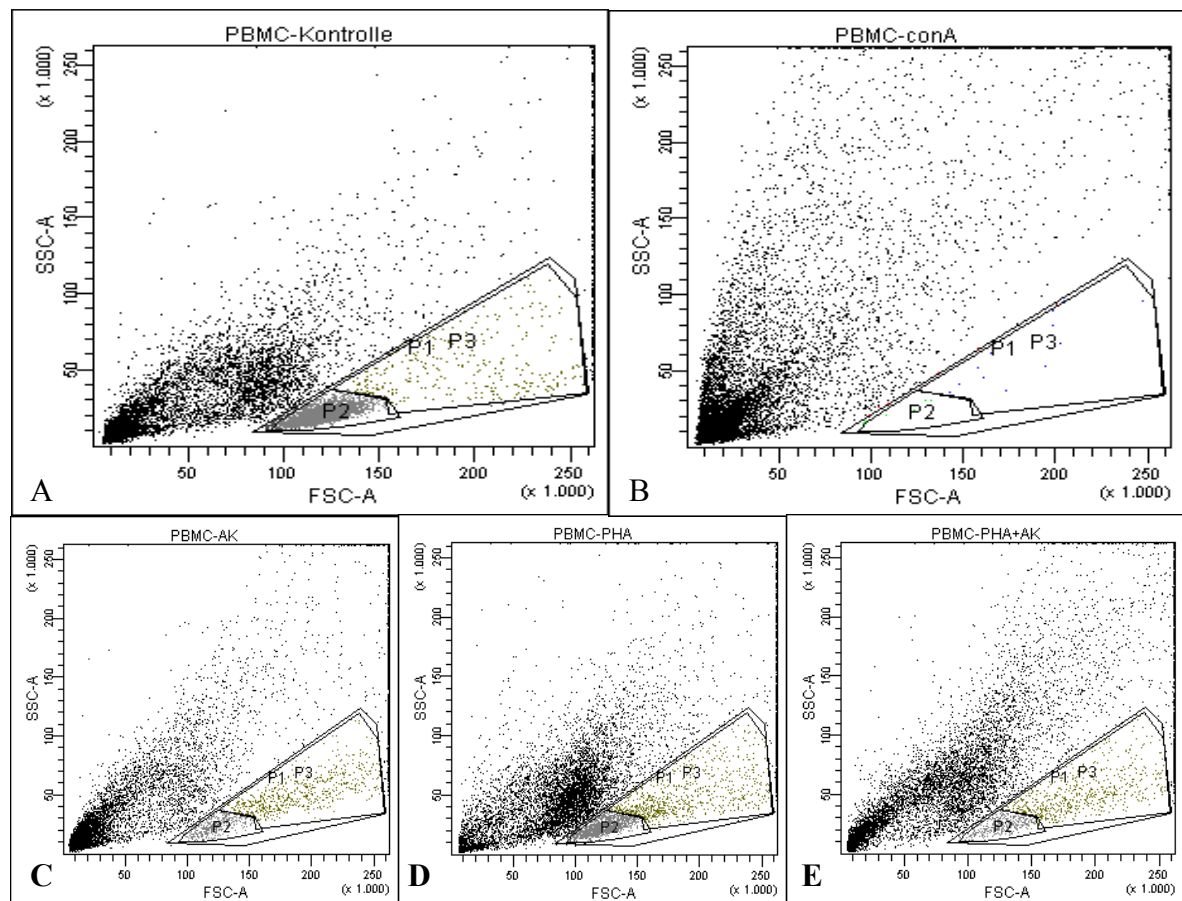


Abbildung 8 – Durchflusszytometrische Auswertung stimulierter PBMCs. Die Stimulation wurde mit PHA (0,05 mg/ml), Antikörpern (10 μ g/ml aCD3e und 2 μ g/ml aCD28) und ConA (5 μ g/ml) durchgeführt. Die proliferierende Lymphoblasten-Population wurde wie angezeigt gegatet (P3) im Verhältnis zu den nicht-proliferierenden Lymphozyten (P2).

Tabelle 10 – Anteile der proliferierten und nicht proliferierten Lymphozyten an der Gesamtlymphozytenzahl

	P2	P3
ConA	23,1 %	46,2 %
PHA	58,8 %	37,1 %
Antikörper	38,6 %	60,1 %
Antikörper + PHA	36,8 %	59 %
Kontrolle	87,2 %	9,8 %

Tabelle 10 weist den Anteil proliferierender Zellen an der Gesamtpopulation der Lymphozyten (P1) auf. Bei Con A löst sich diese Wolke gänzlich auf (Abb. 8B), es ist also nicht davon auszugehen, dass primär Lymphozyten zur Proliferation durch ConA angeregt werden. Im Gegenzug dazu sind sowohl bei der PHA also auch der Antikörper Stimulation proliferierende Blasten als zunehmender Zellcluster neben der ruhenden Lymphozyten-Population wahrzunehmen (Abb. 8C-D). Das Wachstum dieser Wolke fällt darüber hinaus bei PHA stärker aus als bei der Antikörperstimulation. Dies könnte auf eine eingeschränkere Proliferation vermittelt durch die Antikörper hindeuten, da lediglich die spezifische Subgruppe der CD3+CD28+ T-Zellen zur Proliferation angeregt wird. Dafür spricht auch die Verstärkung des proliferativen Effektes bei Kombination der PHA und Antikörper vermittelten Stimulation (Abb. 8E).

3.1.3 Medienwechsel

Um zu untersuchen, ob ein Medienwechsel 24 h nach der Transfektion einen Einfluss auf die Proliferation stimulierter Zellen besitzt, wurden PBMCs mit Antikörpern und PHA stimuliert und ein Kontroll-*antisense*-Oligonukleotid mit PEI wie zuvor beschrieben transfiziert. Um zu prüfen, ob sich exzessive Transfektionschemikalie prinzipiell auf die Stimulation auswirkt, wurde nach 24 h ein Medienwechsel durchgeführt, wobei die Stimulation im neuen Medium beibehalten wurde. Zu diesem Zeitpunkt ist von einer vollständigen Aufnahme der PEI-Nukleinsäure Komplexe in die Zielzellen auszugehen, welches sich durch Messungen Fluoreszenz-markierten *antisense*-Molekülen bestätigt (interne Daten, hier nicht gezeigt). Auch ist im Rahmen einer klinischen Anwendung physiologisch nur von einer kurzen Kontaktzeit zwischen PEI-Komplexen und dem Zielgewebe auszugehen. Abbildung 9 zeigt, dass eine längere Verweildauer von PEI-Komplexen ohne Medienwechsel die Proliferationsraten von PBMCs signifikant erhöht.

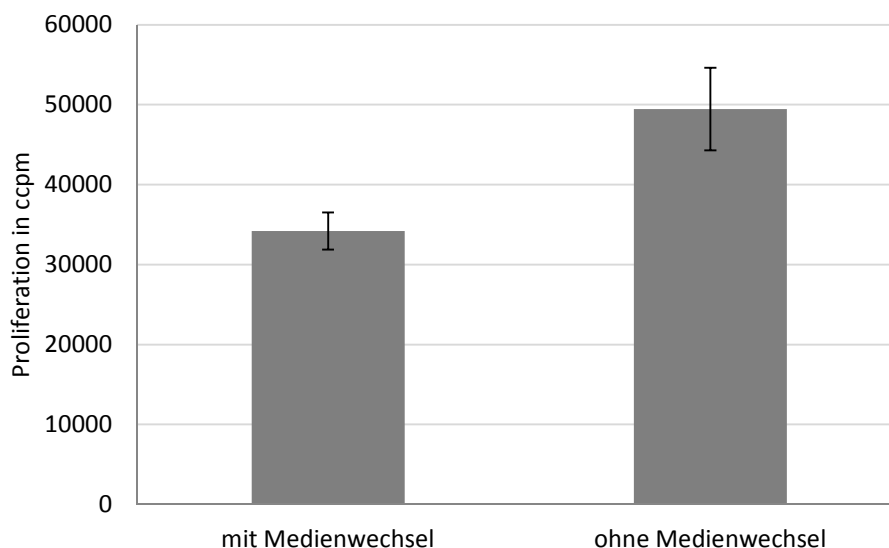


Abbildung 9 – Einfluss der langfristigen Exposition von PEI-Komplexen auf die Proliferation von stimulierten PBMCs. AONs (0,5 µg) wurden in PBMCs (1 Spender) mit PEI (Konzentrationsverhältnis 1:5) transfiziert und anschließend mit aCD3e/aCD28 Antikörpern und PHA für 72h ko-stimuliert. Nach 24h erfolgte wahlweise ein Medienwechsel, wobei die Stimulation dem neuen Medium wieder zugesetzt wurden. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

3.2 Einfluss von Transfektionschemikalien auf die Proliferation

3.2.1 LTT

Um den Einfluss von verschiedenen Transfektionschemikalien die Proliferation von Zellen zu untersuchen, wurden PBMCs drei verschiedener Spender mit PHA stimuliert, transfiziert und die Proliferation anschließend in einem LTT in Triplikaten gemessen.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 10 dargestellt. Aufgetragen sind die Proliferationsraten (in cell count per minute, CCPM) gegenüber den verwendeten Transfektionschemikalien. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (H₂O) weisen alle Methoden welche magnetische Partikel enthalten (hellgrau) einen durchschnittlich hemmenden Effekt auf.

Keine klare Präferenz gab es bei kationischen Polymeren (dunkelgrau) oder Lipofektionsagenzien (grau), von denen einige (Ibafect, Lipofektamin) die Proliferation begünstigten, während andere keinen signifikanten Einfluss hatten.

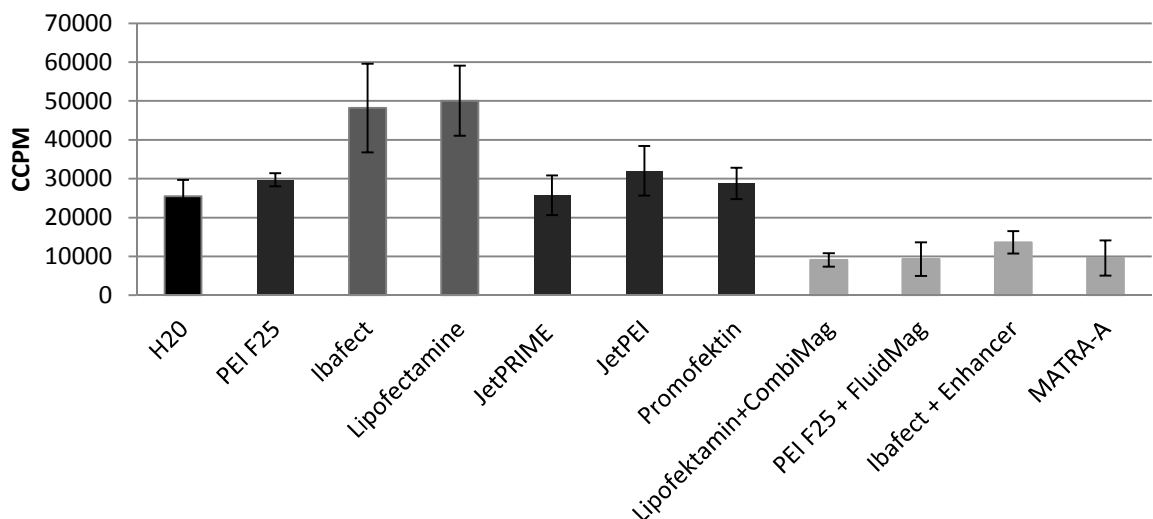


Abbildung 10 – Vergleich des Einflusses von Transfektionschemikalien auf PBMCs (3 Spender). Die PBMCs wurden nach oben genanntem Schema ohne AONs transfiziert und mit PHA (0,05 mg/ml) für 72h stimuliert. Der LTT wurde im genannten Labor 72h nach Versuchsbeginn durchgeführt. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

3.2.2 BrdU

Um zu untersuchen, ob die im LTT gemessenen Proliferationseffekte mit einem veränderten Zellzyklus zusammenhängen, wurden die Zellzyklusphasen mit Hilfe eines BrdU/7-AAD Assays analysiert. Hierfür wurden über zwölf Tage PBMCs eines Spenders, mit verschiedenen Transfektionschemikalien (Ibafect, PEI) ohne und mit Magnetbeads behandelt und im Anschluss (Abb. 11).

Insgesamt zeigt sich eine hohe dynamische Entwicklung, insbesondere bei mit PEI behandelten PBMCs. Hier zeigt sich am ersten post-transfizierten Tag eine sprunghafte Zunahme mitotischer Zellen. An Tag 3, dem Tag der Auswertung im LTT, zeigt sich eine über alle Transfektionsmethoden vergleichbarer Anteil sich teilender Zellen (G2 + S) mit Ausnahme der mit PEI und Magnetbeads behandelten Zellen, welche generell in ihrer Proliferation gehemmt erscheinen und kaum Zuwächse in der G2 oder S Phase aufweisen. Aber auch für Ibafect mit der geringeren Proliferationstendenz zeigt sich im Vergleich zur zusätzlichen Behandlung mit Magnetbeads ein vergleichsweise geringerer Anstieg der proliferierenden Zellen an Tag 6.

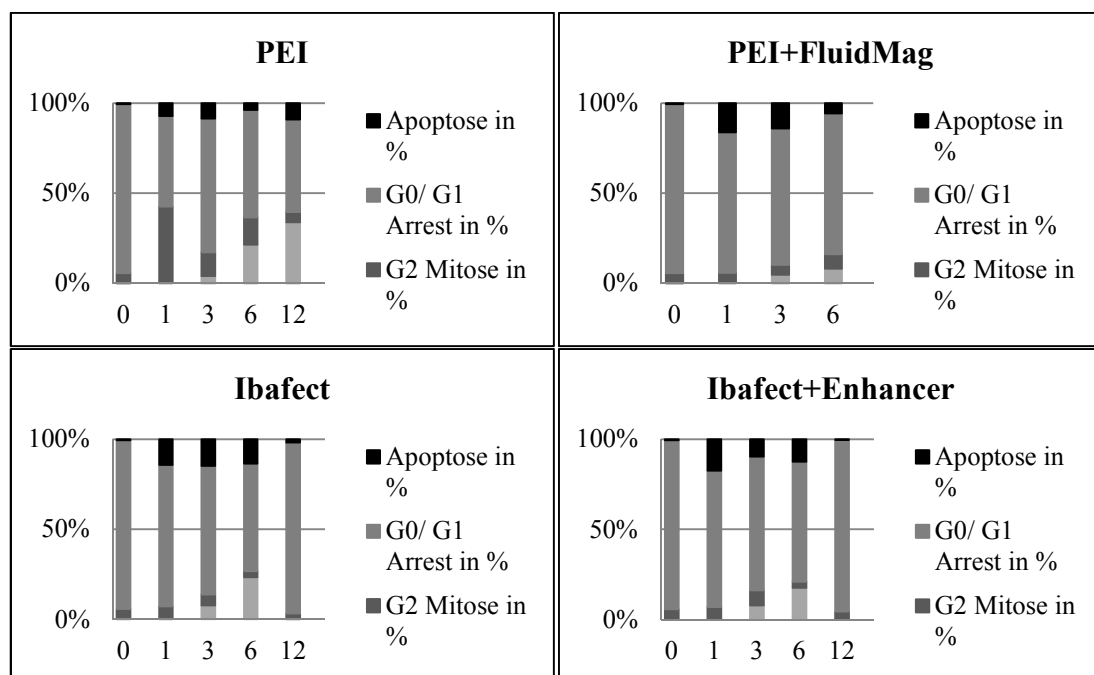


Abbildung 11 – Einfluss der Transfektionschemie auf den Zellzyklus. Die mit PHA (0.05 µg/ml) stimulierten PMBCs wurden 24-48 h mit den Transfektionschemikalien transfiziert. Über den Versuchszeitraum von 12 Tagen wurden mehrmals Medienwechsel durchgeführt nach denen die Stimulation beibehalten wurde. Alle Proben wurden als Duplikate angefertigt.

Die Transfektion von murinen RLD1 Zellen mit reinen Magnetbeads (Matra-A) zeigte ebenfalls eine Zunahme der arretierten Zellen an Tag 1 und eine zunehmende Initiierung des Zellzyklus ab dem 2. Tag (Abb. 12).

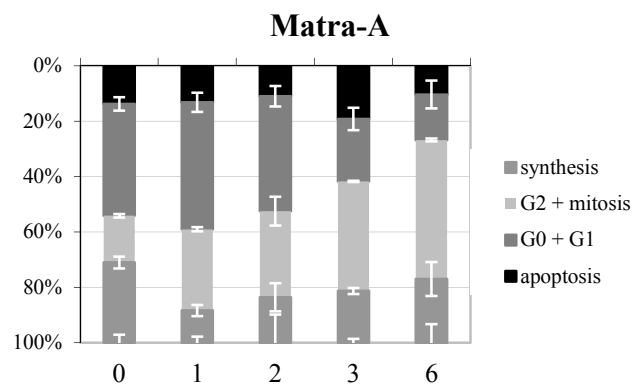


Abbildung 12 – Einfluss reiner Magnetbeads (Matra-A) auf den Zellzyklus muriner RLD1 Zellen. RLD1 Zellen wurden mit Magnetbeads Matra-A behandelt und über einen Versuchszeitraum von 6 Tagen analysiert. Alle Proben wurden als Duplikate angefertigt.

3.2.3 Real-Time-PCR

Mittels einer Real-Time-PCR wurde beobachtet, welchen Einfluss die Transfektionschemikalien PEI, Ibafect und Lipofektamin, jeweils mit und ohne Magnetbeads, auf mRNA-Ebene auf die Zellproliferation stimulierter und unstimulierter PBMCs ausüben. Als Zielgene wurden dabei CCNB2, welches für das Cyclin B2 kodiert, sowie der Proliferationsmarker MKI67 (Proliferationsgene mit regulatorischer Funktion des Zellzyklus) untersucht.

Es zeigte sich, dass die Expression der Proliferationsmarker CCNB2 und MKI67 im Vergleich zwischen Magnetpartikel behandelten und unbehandelten Zellen sowohl in gänzlich unstimulierten, als auch in stimulierten Zellen signifikant abnahm. Dieser Effekt zeigte sich nicht in Ibafect oder Lipofektamin behandelten Proben (Abb.13).

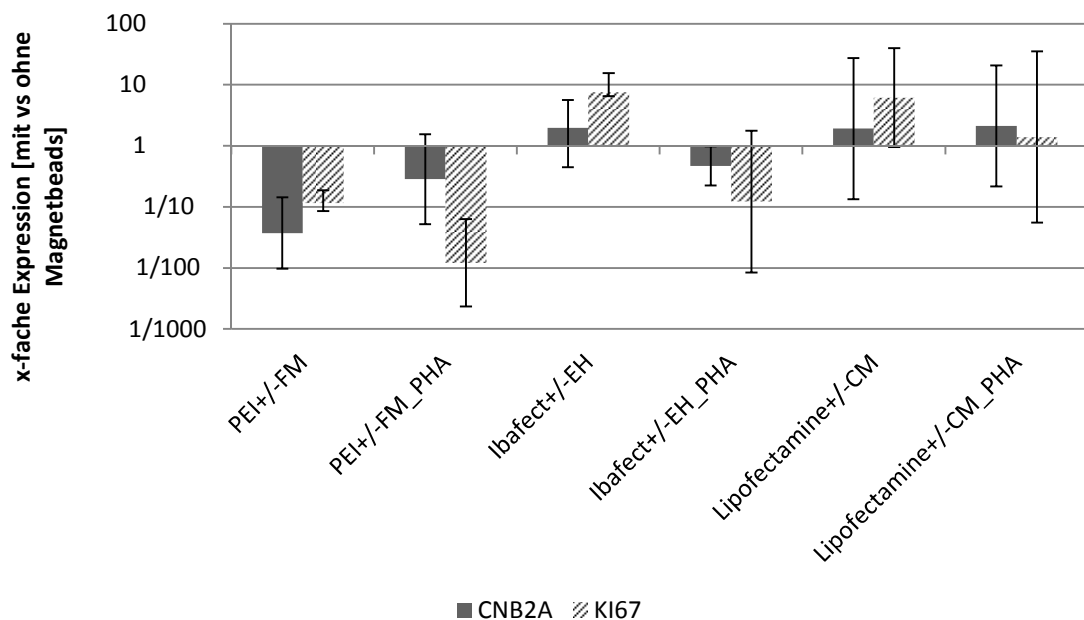


Abbildung 13 – Einfluss von Magnetbeads auf die Expression von Proliferations-Genen KI67 und CNB2A in humanen PBMCs. Humane PBMCs wurden aus zwei Spendern gewonnen, mit Transfektionsagenzien mit oder ohne Magnetbeads versetzt (PEI = Polyethylenimin, FM = FluidMag, EH = Enhancer, CM = CombiMag) und für 72 h mit oder ohne Stimulanz (PHA) unter Standardbedingungen inkubiert. Dargestellt ist in der Kontrast Transfektionsagenz mit Magnetbeads gegen Transfektionsagenz ohne Magnetbeads.

3.3 Einfluss von Oligonukleotiden auf die Proliferation

Um einen eventuell auftretenden Einfluss von transfizierten funktionellen Oligonukleotiden auf die Proliferation stimulierter T-Zellen nachweisen zu können, wurden sowohl humane PBSCs als auch murine Milzzellen mit antisense Oligonukleotiden (AON) oder siRNA transfiziert und die Proliferation im LTT vermessen.

Humane PBMCs von zwei Spendern wurden im LTT in Triplikaten analysiert. Abbildung 14 verdeutlicht den Einfluss der verwendeten AON auf die Proliferation der Zellen. Die Stimulation erfolgte mit Antikörpern. Es wurde eine anti-CD4 siRNA, sowie anti-CD4 und anti-CD28 AONs mit PEI transfiziert. Sowohl anti-CD4 siRNA als auch aCD4-AON zeigt eine signifikante Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle auf.

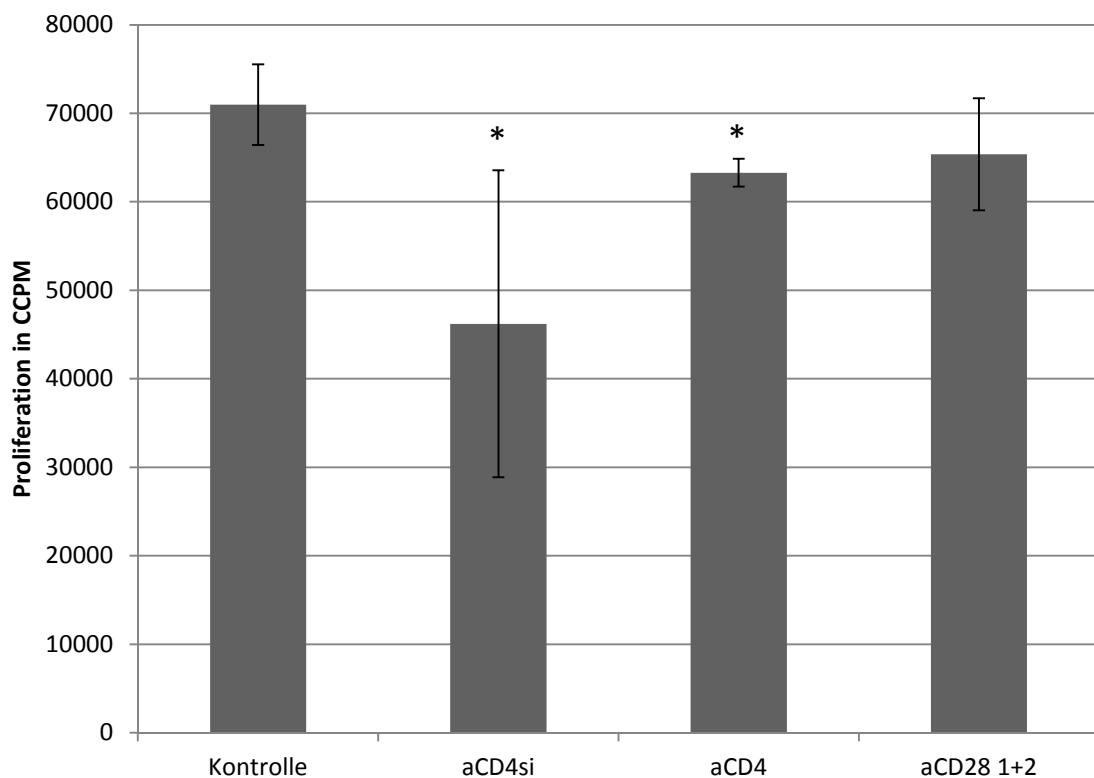


Abbildung 14 – Beeinflussung der Proliferation stimulierter PBMCs durch AONs. Die PBMCs wurden mit AONs nach dem oben genannten Schema transfiziert und mit Antikörper (10 µg/ml aCD3e und 2µg/ml aCD28) für 72 h stimuliert. Aus den Daten der Spender wurde für die Analyse erst der Mittelwert aus den Triplikaten und dann der Mittel der beiden Spender gebildet.

Weiterhin wurden murine Milzzellen ebenfalls mit aCD4 und aCD28-AONs und PEI transfiziert, sowie mit PHA stimuliert,

In Abbildung 15 ist zu erkennen, dass mit PEI behandelte Milzzellen deutlich zur Proliferation durch Stimulation mit PHA angeregt werden. Dieser proliferative Effekt kann durch funktionelle AONs gerichtet gegen CD4 und CD28 wiederum gehemmt werden.

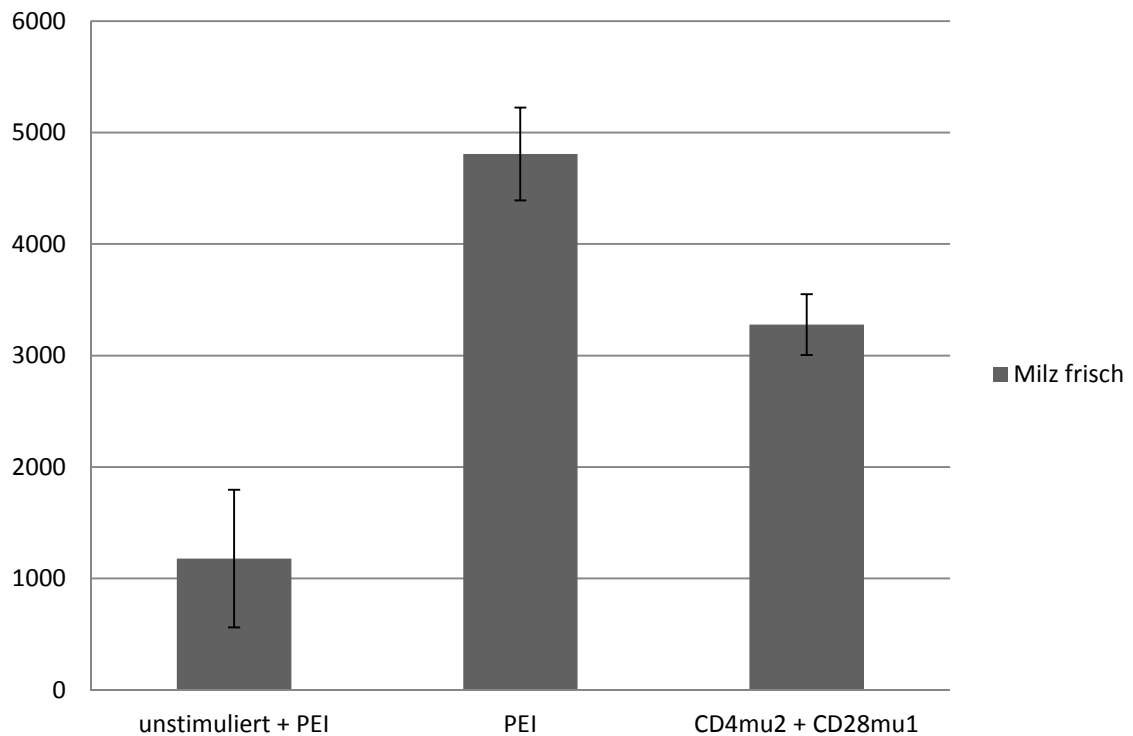


Abbildung 15 – Beeinflussung der Proliferation muriner Milzzellen durch AONs. Die verwendeten Milzzellen wurden mit PHA (0,05 µg/ml) für 72 h stimuliert. Es wurden für alle Proben Triplikate angefertigt.

Im Anschluss wurde der Einfluss dieser AONs auf die Proliferation in weiteren Stimulations-Szenarien bestätigt. Abbildung 16 zeigt, dass sowohl mit ConA, als auch mit Antikörpern stimulierte Milzzellen in ihrer Proliferation durch die funktionellen AONs signifikant gehemmt werden.

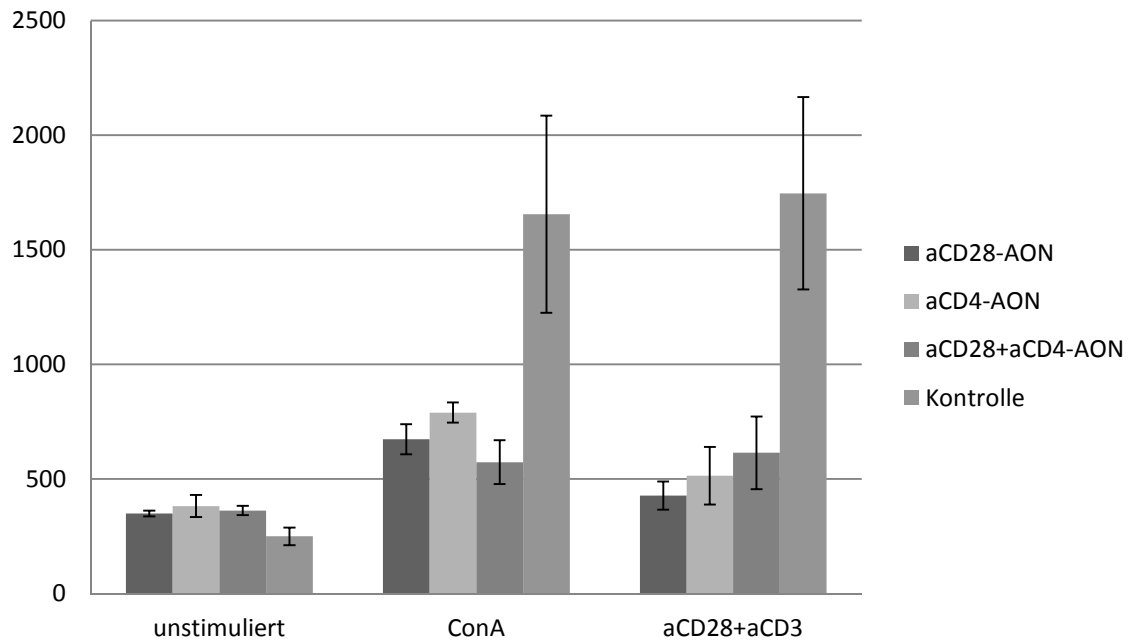


Abbildung 16 – Einfluss von transfizierten AONs auf die Proliferation ConA oder AK stimulierter Milzzellen. Die Zellen wurden mit Antikörpern (10 µg/ml aCD3e und 2µg/ml aCD28) und ConA (5 µg/ml) stimuliert und mit PEI und AONs für 72h transfiziert. Es wurden für alle Kombinationen Triplikate angefertigt.

4. Diskussion

Für die Untersuchung des menschlichen Immunsystems sind insbesondere das adaptive Immunsystem und seine Rolle in pathologischen Prozessen von Bedeutung. [K.A. Smith, 2012]. Ein besonderes Augenmerk wird dabei auf T-Zellen gelegt, deren Ausfall schwerste Immundefekte (zum Beispiel SCID) bedingt, die aber auch bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen und Transplantat-Abstoßungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen. [Parkin & Cohen, 2001] Für die Untersuchung der T-Zellen stehen zahlreiche Untersuchungsmethoden zur Verfügung, die verschiedene Aspekte der T-Zell Funktion beleuchten. Nicht alle diese Methoden sind sowohl für murine als auch humane Testsysteme gut etabliert. Dies wäre aber wünschenswert, da zahlreiche murine präklinische Tiermodelle immunologischer Erkrankungen Verwendung finden. [M.A. King et al, 2009] Im Folgenden soll daher auf die Etablierung von Methoden zur Messung und Analyse der Proliferation sowohl in humanen als auch in murinen *in vitro* Experimenten eingegangen werden:

4.1 Methodenetablierung

Als außerordentlich relevant für den Versuchsaufbau erwies sich ein durchgeführter Medienwechsel im Verlauf des Experimentes. Hierdurch werden 24h nach erfolgter Transfektion überschüssige Nukleinsäure-Partikel und Transfektionschemikalie aus der Zelumgebung entfernt. Eine 24hige Kontaktzeit zwischen Nukleinsäure und Zelloberfläche kann dabei als hinreichend für eine nahezu maximale Aufnahmeleistung der Zellen betrachtet werden [T.K. Kim & J.H. Eberwine, 2010]. Darüber hinaus kann eine verkürzte Kontaktzeit als weitaus physiologischer betrachtet werden, wenn man von einer Injektion eines Gentherapeutikums in den Patienten ausgeht. Hierdurch ist also potentiell auch eine bessere Vergleichbarkeit mit *in vivo* Versuchen gegeben.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die langfristige Inkubation mit überschüssigen Transfektionsagenzien deutliche Einflüsse auf die Proliferationsaktivität von Immunzellen aufwies. Insbesondere primäre Zellen waren von einer signifikanten Erhöhung ihrer Proliferationsfähigkeit betroffen.

Noch deutlicher zeigte sich der Effekt bei der Verwendung von Transfektionschemikalien in Verbindung mit Nukleinsäuren, welche sie in die Zellen schleusen sollen. Da sich die chemischen Eigenschaften von Transfektionschemikalien, insbesondere kationischen Polymeren wie PEI, nach Komplexierung von Nukleinsäuren verändern können, ist hier also insbesondere auf geeignete Kontrollen im Versuch zu achten, welche zu Kontrollzwecken Nukleinsäuren mit *scrambled* oder *nonsense* Sequenzen beinhalten sollten. Auch sollten schon *in vitro* Versuche in Anlehnung an die spätere *in vivo* Situation Kurz-Kontakt Szenarien beinhalten. Nur so kann nachfolgend der wahre Effekt funktioneller Nukleinsäuren realistisch eingeschätzt werden.

Während sich beim Einsatz kryokonservierter PBMCs keine Einschränkung der Proliferationsfähigkeit im Vergleich zu frischen PBMCs zeigte, konnte dies für murine primäre Zellen nicht bestätigt werden. Sowohl >24h kultivierte Milzzellen, als auch kryokonservierte und wieder aufgetaute Milzzellen büßten ihre Proliferationsaktivität auf einen Stimulationsreiz beinahe komplett ein. In der Literatur ist eine alternative Kultivierung nach Robert R. Rich und Carl W. Pierce beschrieben. Sie fügten dem verwendeten Medium zusätzlich L-Glutamin hinzu, ein wesentlicher Bestandteil des Blutes. Außerdem verwendeten sie bei der Inkubation im Brutschrank ein Luftgemisch mit 10 % CO₂-Gehalt. [R.R. Rich & C.W. Pierce, 1972] Im Gegensatz dazu wurde bei den durchgeführten Experimenten stets ein CO₂-Gehalt von 5 % verwendet.

Insbesondere auch die Kryokonservierung wirkt sich generell schlecht auf den Zustand von primären murinen Milzzellen aus, da schon das Auftauen mit einem großen Vitalitätsverlust von 40-50 % verbunden ist. Diese Werte sind vergleichbar mit den Werten von J.J. Jennings et al. [J.J. Jennings et al., 1978] und ließen sich auch nicht durch inzwischen modernere Kühlsysteme verbessern.

Im Vergleich lag die Vitalität humaner PBMCs nach dem Auftauen durchschnittlich bei über 80 %. Dies entspricht den Werten einer Studie von 2008, die durch die Arbeitsgruppe um Adriana Weinberg an der Los Angeles School of Medicine durchgeführt wurde. Sie untersuchten das Verhalten verschieden behandelter PBMCs bei variierten Einfrier- und Auftauprozessen. Ihre Untersuchungen ergaben, dass menschliche periphere Blutzellen auch im Vergleich verschiedener Kryokonservierungsmethoden nach dem Wiederauftauen eine Vitalität größer gleich 85% besitzen. Ausnahmen dabei bildeten Varianten, bei denen die Geschwindigkeit des Auftauen- bzw. des Einfrierens verlangsamt wurde. [A. Weinberg et al., 2008] Bei den hier durchgeführten Experimenten wurde allerdings auf ein schnelles Auftauen geachtet.

Um ein möglichst physiologisches Testsystem *in vitro* zu entwickeln ist weiterhin insbesondere bei Zellgemischen auf die geeignete Stimulationsmethode zu achten. So ist bei der Stimulation von PBMCs ein signifikanter Unterschied in der Proliferation in Abhängigkeit des verwendeten Stimulationsagenses zu erkennen. So erscheint die Stimulation der Lymphozyten mit ConA am wenigsten lymphoproliferativ und für die nachfolgenden Versuche wenig geeignet. Dafür scheinen unter ConA Behandlung insbesondere die morphologisch größeren Bestandteile des PBMC-Zellgemisches, Monozyten und Granulozyten, zu proliferieren (Abb. 8). Im Rahmen der Arbeit wurde mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml gearbeitet, es ist aber gegebenenfalls eine dynamische Proliferationsreaktion auf verschiedene Konzentrationen eines Stimulanz zu erwarten.

Im Gegensatz zu ConA zeigt die Stimulation von PBMCs mit PHA oder aCD3e/CD28 Antikörpern einen deutlich lymphoproliferativen Effekt. Dieser Effekt war deutlicher unter PHA Stimulation ausgeprägt. Jedoch ist die Stimulation mit Antikörpern selbst sehr variabel. Die im Rahmen der Arbeit verwendete Methode mit Zellen, welche durch eine immobilisierende Schicht des anti-CD3e Antikörpers am Grund des Reaktionsgefäßes adhärirt werden, mag die Proliferation der Zielzellen durch Reduktion auf eine 2 dimensionale Ausbreitungsebene verringern. Eine andere Variante des Einsatzes von stimulierenden Antikörpern stellt der Einsatz von Antikörperbeschichteten-Nanopartikeln dar. Diese Modifikation entspricht stärker den physiologischen Bedingungen, wobei durch die Nanopartikel Antigenpräsentierende Zellen simuliert werden, welche suspensorisch, also 3 dimensional, auf die Zielzellen einwirken können. [A. Trickett & Y.L. Kwan, 2003] Weiterhin gibt es zu Bedenken, dass die Antikörper-basierte Stimulation eine sehr spezifische ist, welche lediglich PBMC-Subpopulationen, in diesem Fall CD3+CD28+ T-Zellen, erreicht. Stimulantien mit breiterer Effektivität könnten daher höhere Proliferationsraten aufzeigen, hinter denen sich aber unspezifischere Zellpopulationen verbergen. [H. Rüdiger, 1978]

In der vorliegenden Arbeit erwies sich die Kombination aus Antikörper und PHA am effektivsten. Dass sich die Proliferationsraten nicht addieren, spricht zumindest zum Teil für überlappende Zielzellpopulationen (Abb. 8). Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde die Stimulation mit ConA zugunsten PHAs bzw. Antikörper-basiert verworfen.

Sollten spezielle Subpopulationen das Ziel eines therapeutischen Ansatzes sein, ist es weiterhin zu Bedenken diese Populationen vor einem Experiment gezielt zu isolieren. Zahlreiche Systeme existieren zur Isolation von Immunzell-Subpopulationen, zum Beispiel CD4⁺ T-Helferzellen mittels Antikörper-vermittelter Separation. [T.J. Murphy et al., 2005] Ein Nachteil dieser Systeme liegt jedoch in der Manipulation am Rezeptor-System der Zellen, da dieses in der Regel Ziel des Eingriffes darstellt. Eine weitere Möglichkeit stellt die Kultivierung und Stimulation von T-Zellen auf semi-festem Agarose-Medium dar, wobei die CD8-Stimulation bei gleichbleibender CD4-Stimulation gehemmt wird [N. Oudrhiri et al., 1990].

4.2. Einfluss von Transfektionschemikalien auf die Proliferation von T-Zellen

In den verwendeten Tests (LTT, BrdU) konnte ein Einfluss der Transfektionschemikalien festgestellt werden. Hierfür ergänzen sich die Ergebnisse zu einem gemeinsamen Bild. Jeder dieser Test besitzt seine eigenen Vor- und Nachteile und somit seine eigene Wichtigkeit. Dennoch bleibt zu sagen, dass die Fragestellung die Wahl der Testverfahren bestimmt.

Als wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist die Beeinflussung der Proliferation durch Transfektionschemikalien unabhängig von funktionellen Nukleinsäuren zu sehen. Es konnte nachgewiesen werden, dass insbesondere Methoden, welche magnetische Partikel enthalten die Proliferation von humanen PBMCs und murinen RLD1 Zellen signifikant hemmen.

Im BrdU-Test zeigte sich darüber hinaus im Vergleich zur Verwendung einer Transfektionschemikalie mit oder ohne magnetische Partikel, insbesondere für das polykationische PEI, eine deutliche Reduktion der Zellen im Mitose und Synthese-Stadium. Es kann also vom Ausbleiben der proliferierenden Reaktion auf einen stimulatorischen Reiz durch anhaltenden Arrest des Zellzyklus ausgegangen werden. Dieser Effekt ist auch bei der alleinigen Verwendung von Magnet-Partikeln (Matra-A) zu erkennen.

Auch die Expression von Proliferationsmarker MKI67, insbesondere aber dem Cyclin B2 Gen zeigte sich im Vergleich der Transfektionsmethoden bei zusätzlicher Verwendung von Magnetpartikeln besonders zusammen mit PEI verringert. Der im BrdU-Test beobachtete Zellzyklus-Arrest wird also von einer reduzierten Expression des für die Mitose hoch spezifischen CCNB2 begleitet.

Die Ursache dieser hemmenden Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Proliferation der untersuchten stimulierten Zellen ist noch völlig unklar. Es ist bekannt, dass sich die endozytotische Aufnahme von PEI-Nukleinsäure Komplexen im Vergleich zu PEI-Nukleinsäure-Magnet-Partikel Komplexen nicht signifikant unterscheidet. [S. Huth et al., 2004] Denkbar wäre jedoch, dass die durch das magnetische Feld vermittelte Sedimentierung der Komplexe auf die Oberfläche der Zielzellen, und somit kurzfristig annehmbar stark erhöhte Aufnahmeraten die Proliferation behindern. Endozytotische Vorgänge und die Prozesse zur Formung des Spindelapparates zu Beginn der Mitose sind eng miteinander verwoben. [M. Fürthauer & M. Gonzáles-Gaitán, 2009] So ist bekannt, dass Zellen zu Beginn der Mitose ihre endozytotische Aktivität einstellen. [A.B. Fielding & S.J. Royle, 2013] Ein zugrunde liegender Mechanismus basiert auf der Expansion der Membran, wodurch die Membranspannung erhöht wird.

Dieser Effekt konnte durch Zusatz von amphiphilen Substanzen und deren entspannender Wirkung auf die Membran auf ein Interphase-Niveau abgesenkt werden. [D. Raucher & M.P. Sheetz, 1999] Im umgekehrten Fall könnte eine erhöhte Endozytose-Rate, propagiert durch eine hohe Kontaktrate zwischen Nanokomplexen und Zellen, einen hemmenden Einfluss auf die Induktion der Mitose aufweisen.

Magnetische Nanopartikel haben bereits ein breites Anwendungsspektrum. Sie können zum einen verwendet werden, um Medikamente sehr breit und sehr schnell im Körper zu verteilen. Zudem ermöglichen die Magnetpartikel eine *in vivo* Verfolgung eines derart markierten Medikamentes oder von therapeutischen Zellpräparaten mittels MRT [Kim JE et al., 2012]. Zwar gibt es entsprechend umfangreiche Studien zur Auswirkung der Nanopartikel auf die Vitalität von Zellen und Geweben, welche weitestgehend unbeeinflusst bleibt [Dave und Gao, 2009] und die Partikel gelten gemeinhin als nicht-toxisch.

Allerdings konzentrieren sich die bisherigen Arbeiten nicht auf das Immunsystems und die spezifischen Funktionen von Immunzellen. Zwar stellten sich auch in unseren Arbeiten die Eisenpartikel prinzipiell als nicht-toxisch heraus, allerdings wäre eine Repression des Immunsystems durch Unterdrückung der proliferativen Reaktion auf einen stimulierenden Reiz potentiell ebenfalls schädlich. Beispielsweise könnte in bereits immungeschwächten onkologischen Patienten eine weitere Schwächung der T-Zell basierten zellulären Abwehr zur Zunahme opportunistischer Infektion führen.

Eine weitere Möglichkeit wäre aber auch die optionale therapeutische Applikation proliferationshemmender Partikel. Beispielsweise wird im Rahmen onkologischer Entartungen der Zellzyklus einer entartenden Zelle durch dauerhafte Aufhebung des Zellzyklus-Arrestes dereguliert. Eine ungewollte anhaltende Proliferation der entarteten Zellen bis hin zum klinischen Krankheitsbild einer onkologischen, womöglich metastasierenden Erkrankung ist die Folge. Hier wäre die Unterstützung antiproliferativer Therapeutika, insbesondere auch von Gentherapeutika, ein durchaus gewünschter Effekt.

Strebt man an Stammzellen gentherapeutisch zu erreichen, sollte ebenfalls sichergestellt werden, dass die Transfektionsmethode deren Stammzell-Potential, Differenzierung und Homing nicht nachhaltig beeinflusst.

Zukünftig sollten sich daher weiterführende Untersuchungen zur Aufklärung der biochemischen Grundlage des durch magnetische Partikel vermittelten proliferationshemmenden Effektes anschließen. Hierbei ist der beobachtete Effekt jedoch nicht nur für Immunzellen von Interesse, sondern auch für Stammzellen und onkologisch entartete Zellen.

Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit der proliferationshemmende Effekt von Gentherapeutika nachgewiesen werden. Dabei wurden insbesondere die stimulierenden T-Zell-Rezeptoren CD4 und CD28 anvisiert. Sowohl im murinen als auch humanen *in vitro* Versuch zeigten sich hier die Proliferationsraten so behandelter primärer Zellen deutlich reduziert. Dies für murine Milzzellen auch unabhängig von der Stimulationsmethode. Es ist daher von einem generellen Effekt der getesteten Oligonukleotide auszugehen.

Zukünftig sollen die derart etablierten effektiven Oligonukleotide in murinen oder humanisierten Krankheitsmodellen eingesetzt werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Transfektion von Transplantaten *ex vivo*, wie sie im Rahmen von GvHD-Modell erfolgen kann. Sollte sich der proliferationshemmende Effekt der untersuchten Oligonukleotide im Tiermodell bestätigen, so könnte sich eine neue Klasse von Immuntherapeutika bzw. Immunsuppressiva auf Basis der hier aufgezeigten gentherapeutischen Ansätze ergeben. Insbesondere bei schwer therapierbaren und zu einem gewissen Prozentsatz immer noch letal verlaufenden Erkrankungen wie GvHD wäre eine solche weitere Therapieoption wünschenswert.

5. Literatur

D. Dasgupta (1999), An Overview of Artificial Immune Systems and Their Applications, Artificial immune Systems and Their Applications, pp 3-21

Christoph J. Binder, Peter X. Shaw, Mi-Kyung Chang, Agnès Boullier, Karsten Hartvigsen, Sohvi Hörkkö, Yury I. Miller, Douglas A. Woelkers, Maripat Corr, Joseph L. Witztum (2005), The role of natural antibodies in atherogenesis, the Journal of Lipid Research, 46, 1353-1363.

J. Parkin, B. Cohen (2001), An overview of the immune system, IMMUNOLOGY

H. Rüdiger (1978), Lectine, pflanzliche zuckerbindende proteine, Naturwissenschaften May 1978, Volume 65, Issue 5, pp 239-244

F.C. Bonilla, H.C. Oettgen (2010), Adaptive immunity, Journal of Allergy and Clinical Immunology, Volume 125, Issue 2, Supplement 2, Pages S33–S40

Katarina Le Blanc, Ida Rasmusson, Berit Sundberg, Cecilia Götherström, Moustapha Hassan, Mehmet Uzunel, Olle Ringdén (2004), Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells, The Lancet, vol. 363, Issue 9419, pp. 1439-1441

SD Wright, RA Ramos, PS Tobias, RJ Ulevitch, JC Mathison (1990), CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science*, Vol. 249 no. 4975 pp. 1431-1433

K. O'Flynn, A.M. Krensky, P.C.L. Beverley, S.J. Burakoff, D.C. Linch (1985), Phytohaemagglutinin activation of T cells through the sheep red blood cell receptor, *Nature* 313, 686-687

Cavazzana-Calvo M, Fischer A., Gene therapy for severe combined immunodeficiency: are we there yet?, *J Clin Invest.* 2007 Jun;117(6):1456-65

- F.C. Garbrecht, C. Russo, M.E. Weksler (1987), Long-term growth of human T cell lines and clones on anti-CD3 antibody-treated tissue culture plates, *Journal of Immunological Methods*, 107, 137-142 Elsevier
- A. Trickett, Y.L. Kwan (2003), T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads, *Journal of Immunological Methods* 275, 251– 255
- S.T. Riddell, P.D. Greenberg (1990), The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells, *Journal of Immunological Methods*, Volume 128, Issue 2, Pages 189–201
- Geary RS., Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism., *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2009 Apr;5(4):381-91
- J. Schreiber, G. Zissel, U. Greinert, M. Schlaak, J. Müller-Quernheim (1999), Lymphocyte transformation test for the evaluation of adverse effects of antituberculous drugs, *European Journal of Medical Research* 4(2):67-71.
- Sonja Sieben, Michael Hertl, Tames Al Masaoudi, Hans F. Merk, Brunhilde Blömeke (2001), Characterization of T Cell Responses to Fragrances, *Toxicology and Applied Pharmacology*, Volume 172, Issue 3, Pages 172–178
- Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW., Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd., *Cell Tissue Kinet.* ; 17(4):427-36.
- B. Halpern, N. Amache (1967), Diagnosis of drug allergy in vitro with the lymphocyte transformation test, *Journal of Allergy*, Volume 40, Issue 3, Pages 168–181
- A. Bruce Lyons, Christopher R. Parish (1994), Determination of lymphocyte division by flow cytometry, *Journal of Immunological Methods*, Volume 171, Issue 1, Pages 131–137
- T. K. Kim, J.H. Eberwine (2010), Mammalian cell transfection: the present and the future, *Anal Bioanal Chem* (2010) 397:3173–3178

S.L. Waldrop, C.J. Pitcher, D.M. Peterson, V.C. Maino, L.J. Picker (1997), Determination of antigen-specific memory/effector CD4⁺ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency, *The Journal of Clinical Investigation* 99(7): 1739–1750

H.G. Gratzner (1982), Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication, *Science*, Vol. 218 no. 4571 pp. 474-475

K. Vermeulen, Dirk R. Van Bockstaele, Zwi N. Berneman (2003), The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Proliferation*, Volume 36, Issue 3, pages 131–149

U. Schneider, H.U. Schwenk, G. Bornkamm (1977), Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *International Journal of Cancer* 19(5): 621-6.

M.A. King (2008), *The Humanized Mouse Model: The Study of the Human Alloimmune Response: A Dissertation*, University of Massachusetts Medical School

M. A. King, L. Covassin, M. A. Brehm, W. Racki, T. Pearson, J. Leif, J. Laning, W. Fodor, O. Foreman, L. Burzenski, T. H. Chase, B. Gott, A. A. Rossini, R. Bortell, L. D. Shultz, D. L. Greiner (2009), Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex, *Clinical and Experimental Immunology*

Landberg G, Roos G. (1993), Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation., *Cell Prolif.*; 26(5):427-37.

Gong D, Ferrell JE Jr. (2010), The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events., *Mol Biol Cell*. 2010 Sep 15;21(18):3149-61

R. Y. Walder, J. A. Walder (1988), Role of RNase H in hybrid-arrested translation by antisense Oligonucleotides, Proc. Nati. Acad. Sci. USA
Vol. 85, pp. 5011-5015

B. Bolon (2012), Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease, Toxicol Pathol. ;40(2):216-29

R. Tripmacher (2004), Untersuchungen zu Wirkungen einer eingeschränkten Energiesynthese auf Funktionen von humanen Immunzellen, Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

Yu-Hsiung Wang , Yaling Liu , David W. Rowe (2007), Effects of transient PTH on early proliferation, apoptosis, and subsequent differentiation of osteoblast in primary osteoblast cultures , American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism

F.S. Hassane, A.F. Saleh, R. Abes, M.J. Gait, B. Lebleu (2009), Cell penetrating peptides: overview and applications to the delivery of oligonucleotides, Cell. Mol. Life Sci. 67:715–726

Fricke S, Hilger N, Fricke C, Schönfelder U, Behre G, Ruschpler P, Boldt A, Oelkrug C, Sack U, Emmrich F., Prevention of graft-versus-host-disease with preserved graft-versus-leukemia-effect by ex vivo and in vivo modulation of CD4+ T-cells., Cell Mol Life Sci. 2013 Sep 26.

A.B. Lyons (2000), Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution, Journal of Immunological Methods, Volume 243, Issues 1–2, Pages 147–154

Sang W, Zhou C, Cheng N, Li Z, Zeng L, Xu K. (2011), Control of mouse graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation by blocking the CD28/B7 signaling pathway with lentiviral vector-mediated RNA interference, Immunol Lett., 136(2):194-202

Appleman LJ, Tzachanis D, Grader-Beck T, Van Puijenbroek AA, Boussiotis VA., Induction of immunologic tolerance for allogeneic hematopoietic cell transplantation., Leuk Lymphoma. ;43(6):1159-67.

Linsley PS, Nadler SG., The clinical utility of inhibiting CD28-mediated costimulation., *Immunol Rev.*;229(1):307-21

Sang W, Zhou C, Cheng N, Li Z, Zeng L, Xu K., Control of mouse graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation by blocking the CD28/B7 signaling pathway with lentiviral vector-mediated RNA interference., *Immunol Lett.*;136(2):194-202

P L Felgner, T R Gadek, M Holm, R Roman, H W Chan, M Wenz, J P Northrop, G M Ringold, and M Danielsen (1978), Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure, *PNAS* vol. 84 no. 21, 7413-7417

El-Aneed (2004), An overview of current delivery systems in cancer gene therapy, *Journal of Controlled Release*, Volume 94, Issue 1, Pages 1–14

O. Boussif, F. Lezoualc'H, M.A. Zanta, M.D. Mergny, D. Scherman, B. Demeneix, J.P. Behr (1995), A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: Polyethylenimine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 92, pp. 7297-7301

Ian A. Pringle, Stephen C. Hyde, Mary M. Connolly, Anna E. Lawton, Bihui Xu, Graciela Nunez-Alonso, Lee A. Davies, Stephanie G. Sumner-Jones, Deborah R. Gill, CpG-free plasmid expression cassettes for cystic fibrosis gene therapy, *Biomaterials*, Volume 33, Issue 28, Pages 6833–6842

J. Dobson (2006), Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery, *Gene Therapy* (2006) 13, 283–287

B.M Paterson, B.E. Roberts, E.L. Kuff (1977), Structural gene identification and mapping by DNA*mRNA hybrid-arrested cell-free translation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 74, No. 10, pp. 4370-4374, October 1977

Sabrina Oliveira, Gert Storm, and Raymond M. Schiffelers (2006), Targeted Delivery of siRNA, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Volume 2006, Article ID 63675, Pages 1–9

J. Schäfer, S. Höbel, U. Bakowsky, A. Aigner (2010), Liposome–polyethylenimine complexes for enhanced DNA and siRNA delivery, *Biomaterials*, Volume 31, Issue 26, Pages 6892–6900

G. Zuber , E. Dauty, M. Nothisen, P. Belguise, J.P. Behr (2001), Towards synthetic viruses, *Advanced Drug Delivery Reviews* 52, 245–253

Dean PN, Dolbeare F, Gratzner H, Rice GC, Gray JW., Cell-cycle analysis using a monoclonal antibody to BrdUrd., *Cell Tissue Kinet.* 1984 Jul;17(4):427-36.

Merk HF., Diagnosis of drug hypersensitivity: lymphocyte transformation test and cytokines., *Toxicology.*;209(2):217-20.

J. Aigner (2006), Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo, *J. Biomed. Biotechnol.*

J.R Bertrand, Mireille Pottier, Antoine Vekris, Paule Opolon, Andrei Maksimenko, and Claude Malvy (2002), Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 296 (2002) 1000–1004

OZ Biosciences, Magnetofection™ PolyMag, CombiMag, PolyMag Neo, Instruction Manual

H. Gul-ULUdag, Peng Xu, Leah A. Marquez-Curtis, James Xing, Anna Janowska-Wieczorek, Jie Chen (2012), Cationic Liposome-Mediated CXCR4 Gene Delivery into Hematopoietic Stem/Progenitor Cells: Implications for Clinical Transplantation and Gene Therapy, *STEM CELLS AND DEVELOPMENT*, Volume 21, Number 10, 2012

Stephanie Werth, Beata Urban-Klein, Lige Dai, Sabrina Höbel, Marius Grzelinski, Udo Bakowsky, Frank Czubyko, Achim Aigner (2006), A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes, *Journal of Controlled Release* 112 (2006) 257–270

Polyplus, jetPRIME® *in vitro* DNA & siRNA transfection reagent PROTOCOL

Polyplus, jetPEI® *in vitro* DNA Transfection Protocol

J. Beisner, M. Dong, S Taetz, K. Piotrowska, E. Kleideiter, G. Friedel, U. Schaefer, C.M. Lehr, U. Klotz, Thomas E. Mürdter (2008), Efficient Telomerase Inhibition in Human Non-small Cell Lung Cancer Cells by Liposomal Delivery of 20-O-Methyl-RNA, Published online 19 September 2008 in Wiley InterScience

PromoCell, PromoFectin Transfection Reagent, Manual

PromoCell, Magnet Assisted Transfection (MATra), Instruction Manual

C. Plank, O. Zelphati, O. Mykhaylyk (2011), Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection—Progress and prospects, *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 1300–1331

K.A. Smith (2012), Toward a molecular understanding of adaptive immunity: a chronology, part I, REVIEW ARTICLE published: 06 December 2012

Phuong Ha-Lien Tran, Thao Truong-Dinh Tran, Toi Van Vo, Beom-Jin Lee (2012), Promising iron oxide-based magnetic nanoparticles in biomedical engineering, *Archives of Pharmacal Research*, Volume 35, Issue 12, pp 2045-2061

R.R. Rich & C.W. Pierce (1972), Biological Expressions of Lymphocyte Activation, *The Journal of Experimental Medicine* • Volume 137, 1973 205

J.J. Jennings, S.S. Yanari, R. Reid (1978), Immune Reactivity of Frozen-Thawed Murine Spleen Cells, *CRYOBIOLOGY* 15, 272-278 (1978)

A.J. Beres, W.R. Drobyski (2013), The Role of Regulatory T Cells in the Biology of Graft Versus Host Disease, *Front Immunol.*; 4: 163.

A. Weinberg, Lin-Ye Song, Cynthia Wilkening, Anne Sevin, Bruce Blais, Raul Louzao,

Dana Stein, Patricia Defechereux, Deborah Durand, Eric Riedel, Nancy Raftery, Renee Jesser, Betty Brown, M. Fran Keller, Ruth Dickover, Elizabeth McFarland, and Terence Fenton (2009), Optimization and Limitations of Use of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Functional and Phenotypic T-Cell Characterization, CLINICAL AND VACCINE IMMUNOLOGY, Aug. 2009, p. 1176–1186

Ben J C Quah, Hilary S Warren & Christopher R Parish (2007), Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, Published online 23 August 2007; doi:10.1038/nprot.2007.296

B.J.C. Quah, C.R. Parish (2010), The Use of Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester (CFSE) to Monitor, Lymphocyte Proliferation, Journal of Visualized Experiments

de Both NJ, Rhijnsburger EH, van Ewijk W., A Rauscher-virus-induced T-lymphocyte cell line. Induction of differentiation under influence of dimethylsulfoxide and phorbol esters., Int J Cancer. 1983 Oct 15;32(4):501-6.

van Ommen GJ, van Deutekom J, Aartsma-Rus A., The therapeutic potential of antisense-mediated exon skipping., Curr Opin Mol Ther. 2008 Apr;10(2):140-9.

Thomas J. Murphy, Niamh Ni Choileain, Yan Zang, John A. Mannick, and James A. Le-derer, CD4+ CD25+ Regulatory T Cells Control Innate Immune Reactivity after Injury, The Journal of Immunology

N. Oudrhiri, J.P. Farcet, M.F. Gourdin, E. M'Bemba, PH. Gaulard, A. Katz, M. Divine, A. Galazka. F.Reyes (1990), CD3-T cell receptor modulation is selectively induced in CD8 but not CD4 lymphocytes cultured in agar, Clin. exp. Immunol. (1990) 82, 396-403

Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U, Rosenecker J. (2004), Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer., J Gene Med.;6(8):923-36.

Fürthauer M, González-Gaitán M., Endocytosis and mitosis: a two-way relationship., Cell Cycle., 2009;8(20):3311-8.

Fielding AB, Royle SJ., Mitotic inhibition of clathrin-mediated endocytosis., Cell Mol Life Sci.;70(18):3423-33.

Raucher D, Sheetz MP., Membrane expansion increases endocytosis rate during mitosis., J Cell Biol. ;144(3):497-506.

R Kircheis, A Kichler, G Wallner, M Kurs, M Ogris, T Felzmann, M Buchberger,,
E Wagner (1997), Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery, Gene Therapy (1997) 4, 409–418

Anhang

Abkürzungsverzeichnis

APC – antigen präsentierte Zelle

MHC II - Haupthistokompatibilitätskomplex
IL- Interleukin
CD - Differentiationscluster
GvHD – Graf versus Host Disease
PHA – Phytohämagglutinin
LPS – Lipopolysaccharide
LTT – Lymphozytentransformationstest
CFSE - Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester
DNA – Desoxyribonukleinsäure
BrdU - 5-Bromo-2'-deoxyuridin
PBMC – periphere mononukleäre Blutzelle
RNA – Ribonukleinsäure
AON – antisense Oligonukleotid
PEI – Polyethylenimin
siRNA – kleine interferierende RNA-Moleküle
DMSO - Dimethylsulfoxid
FKS – fetales Kälberserum
PBS/DPBS - Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PCR - Polymerasekettenreaktion
BD - Becton Dickinson
7-AAD – 7-Aminoactinomycin
PFA – Paraformaldehyd
HN-Puffer – Wasserstoff-Stickstoff-Puffer
ConA – Concanavalin A
SSC – Seitwärtsstreulicht
FSC – Frontalstreulicht
CCNB2A - Cyclin 2B
DPPC – Dipalmitoylphosphatidylcholine
HEPES - 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
MRT - Magnetresonanztomographie

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich insbesondere bei meiner Betreuerin Dr. Jana Burkhardt am TRM Leipzig bedanken, die mich mit viel Geduld und Hilfsbereitschaft bei dieser Arbeit motiviert hat.

Auch möchte ich mich bei Susanne Rudzok bedanken, die mir stets bei einer Frage zur Seite stand.

Ebenso geht mein Dank an meinen Betreuer seitens der Hochschule Mittweida, Prof. Dr. Röbbe Wünschiers, der immer bereit mich zu unterstützen

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Leipzig, den 29. September 2013

Marcus Ebert